

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA RECHERCHE ET SUR L'EXISTENCE DE L'ARSENIC DANS L'ORGANISME

PAR M. GABRIEL BERTRAND

Jusqu'aux recherches publiées en 1899 et 1900, par M. Arm. Gautier¹, on admettait, d'une manière absolue, l'absence de l'arsenic dans le corps de l'homme. Les quelques cas où des traces de cet élément avaient été signalées s'expliquaient sinon par l'impureté des réactifs employés pour les recherches, du moins par quelque circonstance accidentelle, comme l'ingestion de médicaments, d'aliments ou de poussières contenant de l'arsenic.

En démontrant que les glandes thyroïdes et quelques autres parties de l'homme et des animaux renferment normalement de petites quantités d'arsenic, M. Arm. Gautier a transformé et défini l'aspect de cette question importante de médecine légale. Bien mieux, il a fait entrer l'étude de l'arsenic dans le domaine de la physiologie.

Mais, pour que cette démonstration, avec toutes ses conséquences, conserve sa valeur, il faut que le fait principal sur lequel elle repose, c'est-à-dire l'existence normale de l'arsenic dans l'organisme, reste établie d'une façon indiscutable. Or, plusieurs mémoires, dus à Hödlmoser², Ziemke³, Cerny⁴,

1. Sur l'existence normale de l'arsenic chez les animaux et sa localisation dans certains organes, *C. R. Acad. d. Sciences*, t. CXXIX, p. 929-936, 1899.

Localisation, élimination et origines de l'arsenic chez les animaux, *C. R. Acad. d. Sciences*, t. CXXX, p. 284-291, 1900.

La fonction menstruelle et le rut des animaux. Rôle de l'arsenic dans l'économie, *C. R. Acad. d. Sciences*, t. CXXXI, p. 364-367, 1900.

2. Enthalten gewisse Organe des Körpers physiologischer Weise Arsen. *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, t. XXXIII, p. 329-344, 1901.

3. *Apotheker Zeitung*, t. XVII, 1902.

4. Ueber das Vorkommen von Arsen im thierischen Organismus, *Zeitsch. für physiol. Chemie*, t. XXXIV, p. 408-416, 1901.

viennent de mettre les assertions de M. Arm. Gautier formellement en doute.

Vivement intéressé par le rôle possible de l'arsenic dans l'organisme vivant, rôle comparable sous certains rapports à celui du zinc, de l'iode, du manganèse et de quelques autres éléments qui n'existent, eux aussi, qu'en très petites proportions, j'ai été conduit à répéter, pour ma part, les expériences de M. Arm. Gautier. Les résultats auxquels je suis parvenu me paraissent si démonstratifs que je crois utile de les communiquer.

Mes premiers essais ont été effectués en janvier 1900, avec des glandes thyroïdes de veau achetées à l'abattoir. Après avoir vérifié qu'un poids de réactifs bien supérieur à celui qui devait être employé dans une expérience ne fournissait pas trace d'arsenic, j'ai examiné comment se comportait la méthode de destruction et de recherche de M. Arm. Gautier en me servant d'abord de 100 grammes de muscles de lapin, puis de 100 grammes des mêmes muscles additionnés de $\frac{1}{10}$ de milligramme d'arsenic : les muscles seuls ne donnèrent rien ; les autres fournirent un enduit arsenical absolument identique à celui qu'on obtenait en introduisant directement $\frac{1}{10}$ de milligramme d'arsenic dans l'appareil de Marsh.

Trente grammes de glandes thyroïdes furent alors attaqués avec soin : ils ne donnèrent aucune trace d'arsenic ; il en fut de même dans un second essai.

Supposant alors qu'il y avait dans le procédé de destruction quelque particularité dont je n'avais pas saisi l'importance, j'eus recours aux conseils personnels de M. Arm. Gautier : le tissu thyroïdien est des plus difficile à détruire et j'avais trop ménagé l'emploi de l'acide nitrique.

De nouveaux essais furent entrepris d'après cette indication ; ils fournirent des anneaux très appréciables d'arsenic. Ces essais furent répétés, avec le même succès, dans mon laboratoire, par M. Guglielmetti, professeur de toxicologie à la Faculté de médecine de Montevideo, et par M. Heupel, mon préparateur. Comme les quantités d'acides employées dans ces nouveaux essais ne s'écartaient pas de celles de l'expérience de contrôle, je me crus en droit d'admettre l'existence de l'arsenic dans la glande thyroïde de veau.

C'est quelques mois plus tard que parut le mémoire de Hödlmoser. L'auteur énumère dans ce mémoire près de 20 expériences, entreprises chacune avec 85 à 200 grammes de glandes thyroïdes humaines. *Sans exception, déclare-t-il, les résultats ont été négatifs.*

Il y avait bien quelquefois des traces à peine perceptibles d'arsenic, mais, ajoute Hödlmoser, ces traces n'apparaissaient pas plus souvent avec les glandes thyroïdes qu'avec les foies des mêmes individus, examinés comparativement. Et il conclut en admettant que les résultats positifs de M. Arm. Gautier sont peut-être en rapport avec la constitution géologique du sol.

Des recherches et des résultats identiques à ceux de Hödlmoser ont été publiés plus récemment encore par Ziemke et par Cerny.

La lecture de ces publications contradictoires, et aussi certaines remarques faites au cours de mes premiers essais, m'ayant mis en défiance contre le procédé de recherche de l'arsenic, je repris successivement l'étude du procédé de Marsh, de la destruction des matières organiques et, finalement, de l'arsenic normal.

En suivant les indications que je vais décrire, on pourra retrouver des quantités infinitésimales d'arsenic et se convaincre de la présence de ce métalloïde dans l'organisme normal.

Je suis arrivé, en effet, à perfectionner dans ses détails d'exécution la méthode bien connue de Marsh au point qu'il est possible d'obtenir des anneaux visibles avec des poids aussi minimes qu'un millième et même un demi-millième de milligramme d'arsenic.

Pour atteindre une sensibilité aussi grande, il faut observer plusieurs précautions. Tout d'abord, l'arsenic doit être rassemblé dans un très petit volume de liquide. J'opère ordinairement avec des volumes tels qu'à la fin de l'opération il n'y ait pas plus de 30 à 60 c. c. de liquide dans l'appareil producteur d'hydrogène. C'est par exception que ce volume atteint le double.

Il faut ensuite débarrasser l'appareil de toute trace d'oxygène; sans cela, une partie ou la totalité de l'arsenic mis en liberté s'oxyde et passe à l'état d'acide arsénieux beaucoup plus difficile et même impossible à apercevoir. On atteint

aisément ce but en purgeant l'appareil, une fois monté et garni de zinc, avec un bon courant de gaz carbonique pur¹. Si on voulait purger avec l'hydrogène produit directement dans l'appareil, on serait conduit, à moins de manœuvres spéciales, faciles à concevoir, à laisser dans celui-ci une quantité notable de liquide acide qui diluerait d'autant la solution arsenicale. On gagne d'ailleurs beaucoup de temps en opérant comme je l'indique; avec un bon courant d'anhydride carbonique, il suffit de quelques minutes pour obtenir une purge parfaite², ce qu'on ne pourrait faire, avec l'ancienne technique, en moins d'une heure, au minimum. Quand l'appareil est bien purgé d'air, on verse sur le zinc 1 ou 2 gouttes de solution de chlorure de platine diluées dans 10 c. c. environ d'acide sulfurique au 1/5, et l'on attend une dizaine de minutes avant d'introduire le liquide arsenical.

Comme tubes à analyse, il faut prendre des tubes de verre de petit diamètre et très finement étirés. Si l'on recherche, par exemple, des quantités notablement inférieures à 1/100 de milligramme, il est bon de prendre des tubes n'ayant pas plus de 1 millimètre de diamètre intérieur.

Après les avoir bien lavés à l'acide sulfurique chaud ou à l'eau régale, puis à l'eau, à l'alcool et à l'éther, on les dessèche complètement. On les coupe d'une longueur telle que l'extrémité libre soit à 10 ou 15 centimètres de l'endroit où se formera l'anneau; enfin, on étire cette extrémité très finement, sur plusieurs centimètres, pour éviter la diffusion de l'air dans leur intérieur, pendant l'opération. Faute de ce soin, des enduits très faibles d'arsenic deviennent invisibles en s'oxydant au fur et à mesure de leur production³.

Il n'est pas nécessaire de chauffer le tube à analyse à une température plus élevée que le rouge naissant, ni même, semble-t-il, sur une grande longueur. Cependant, dans presque

1. Comme on peut en trouver dans les bouteilles d'acide carbonique liquide. Le gaz que j'employais contenait 0,08 0/0 d'oxygène.

2. Au commencement de la purge, on sépare le tubes à analyse, pour que le gaz passe plus facilement.

3. Cette oxydation s'opère même assez vite à froid dans les tubes où on conserve les anneaux, si on n'a pas pris la précaution de sceller les tubes pleins d'hydrogène sec. A la place du dépôt noir, bien visible du métalloyé, on n'a plus alors qu'une trace blanchâtre d'acide arsénieux, quelquefois imperceptible, même sur un fond noir.

toutes mes expériences, j'employais une petite rampe de 20 centimètres de longueur, très commode, de préférence au bec Bunsen à flamme plate qui me servait antérieurement.

Il est utile de dessécher le courant gazeux, au sortir du flacon, en le faisant passer à travers une colonne d'ouate préalablement chauffée à $+ 110-120^{\circ}$. La cellulose ainsi déshydratée retient énergiquement la vapeur d'eau sans agir sur la composition du gaz.

Enfin, pour éviter l'étalement de l'enduit arsenical sur une trop grande surface du tube à analyse, ce qui arrive aisément avec les tubes capillaires à parois épaisses, il est bon de favoriser la condensation immédiate des vapeurs arsenicales en entourant le tube, en un point convenablement choisi, d'un petit réfrigérant.

Celui-ci se compose tout simplement d'une bande de papier à filtrer, de 4 à 5 millimètres de largeur; cette bande fait plusieurs fois le tour du tube et reçoit de l'eau, goutte à goutte, d'un petit réservoir placé au-dessus. L'excès d'eau s'écoule par l'extrémité libre de la bande qui pend sur une longueur de 1 à 2 centimètres. L'enduit d'arsenic, rassemblé ainsi sur un très petit espace, ne risque plus d'échapper à l'observation. Avec des quantités de métalloïde supérieures au $1/100$ de milligramme et des tubes à paroi mince, l'usage du petit réfrigérant n'est plus nécessaire.

En adjoignant toutes les précautions qui viennent d'être énumérées à celles décrites antérieurement par M. Arm. Gautier¹, on peut obtenir, avec $1/1000$ de milligramme d'arsenic, un anneau noir, nettement visible, de plusieurs millimètres de longueur.

On comprend qu'avec un procédé de recherche aussi délicat, il soit très difficile de trouver des réactifs exempts d'arsenic. Cela est vrai surtout pour l'acide nitrique. Le plus pur que j'ai pu me procurer dans le commerce, et qui avait été préparé spécialement, donnait encore près de trois centièmes de milligramme de son poids de métalloïde par kilogramme. Il fut impossible de le débarrasser plus complètement par 3 distillations simples dans une cornue de verre. C'est seulement par 2 nouvelles distillations, en présence, chaque fois, de $1/10$ de son poids

1. *Annales de Chimie et de Physique*, 5^e série, t. VIII, p. 384 (1876).

d'acide sulfurique pur, qu'on put abaisser cette teneur à moins de 1/300.000.000, c'est-à-dire au point de ne plus trouver que 1/1000 de milligramme d'arsenic dans 300 grammes d'acide¹.

La méthode de destruction de la matière organique qui m'a donné les meilleures résultats est celle de M. Arm. Gautier². Les modifications qu'on a récemment proposé de faire subir à cette méthode et qui mettent en jeu une grande quantité d'acide sont mauvaises pour l'étude de l'arsenic normal de l'organisme. Comme j'ai pu m'en convaincre, en effet, par des expériences directes, comme on l'a vu d'ailleurs, à propos de la purification des réactifs, il y a toujours des traces d'arsenic entraînées par les vapeurs acides : de sorte que les modifications proposées, qui conduisent à des solutions complètes de la matière organique, et qui paraissent très bonnes lorsqu'on recherche des quantités appréciables d'arsenic, ne valent plus rien pour des proportions infinitésimales du métalloïde.

En attaquant, par exemple, 50 grammes de foie de veau additionnés de 1/100 de milligramme d'arsenic, par 10 grammes d'acide sulfurique et 45 d'acide nitrique, dans une première expérience; par 50 grammes d'acide sulfurique et 200 d'acide nitrique, dans une seconde, on a obtenu un anneau représentant à très peu près la quantité d'arsenic introduite dans le premier cas, tandis qu'il n'y avait rien ou tout au plus une trace douteuse dans le second.

Au lieu d'acide nitrique seul, pour conduire l'attaque, j'ai trouvé préférable d'employer un mélange de 10 parties d'acide nitrique avec 1 d'acide sulfurique. Ce mélange pénètre mieux la masse charbonneuse et, n'étant pas aussi volatil que l'acide nitrique, il permet, vers la fin de l'attaque, de laver plus facilement les parois chaudes de la capsule. A part cette légère variante, on opère exactement d'après les indications de M. Arm. Gautier; il y a un peu plus d'acide sulfurique dans le liquide d'extraction, mais cela ne présente aucun inconvénient.

Pour déceler des traces d'arsenic aussi minimes que celles

1. L'examen de l'acide se fait en évaporant dans une capsule de porcelaine contrôlée 300 grammes de réactif, versés par portions, avec 20 grammes d'acide sulfurique pur. L'évaporation est poursuivie jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'une quinzaine de grammes d'acide sulfurique; on dilue dans 4 parties d'eau et, après refroidissement, on introduit dans l'appareil de Marsh.

2. *Comptes rendus Ac. d. Sciences*, t. CXXIX, p. 936-938, 1899.

indiquées plus haut, il ne faut introduire dans l'appareil de Marsh que des produits bien attaqués, exempts de matières organiques. Lorsque le précipité, obtenu par l'action du gaz sulfhydrique, donne avec l'ammoniaque une solution brune, chargée de quantités notables de matières organiques, on attaque le résidu laissé par l'évaporation de la solution ammoniacale exactement de la même manière que la matière primitive.

Si la solution aqueuse, séparée par filtration d'un peu de produits humiques, est maintenant incolore ou presque incolore, on l'évapore à sec et le résidu, dissous dans l'acide sulfurique au $1/5$, est versé dans le flacon producteur d'hydrogène. Si, au contraire, la solution aqueuse est fortement colorée en jaune, comme cela arrive quelquefois quand on n'est pas très exercé dans l'emploi de la méthode de destruction, il faut précipiter à nouveau l'arsenic par l'hydrogène sulfuré.

Maintenant que j'ai rapporté mes observations personnelles concernant la recherche de l'arsenic dans les matières organiques, je vais indiquer les résultats que j'ai obtenus en appliquant ces observations à l'étude de l'arsenic normal. A la question : y a-t-il, oui ou non, de l'arsenic dans l'organisme ? je vais répondre d'une façon positive et, je l'espère, à l'abri des critiques.

J'ai évité de me servir pour cette étude de glandes thyroïdes et de tissus humains, parce qu'il est presque impossible d'affirmer que les individus servant aux expériences n'ont jamais été soumis à quelque médication ou contamination arsenicale. J'ai évité aussi les recherches sur le cheval, parce que celui-ci est quelquefois traité par l'acide arsénieux et qu'on ne peut être sûr, par suite, de l'origine naturelle de l'arsenic retrouvé dans ses organes.

J'ai recherché d'abord l'arsenic dans des glandes thyroïdes de veau et de porc, puis dans les soies de ce dernier animal, les plumes de l'oie, la corne du bœuf, les poils et les ongles du chien, etc. Je n'ai pas tardé à remarquer que les tissus kératiniques étaient relativement très riches en arsenic, beaucoup plus même que les glandes thyroïdes.

39 grammes de poils noirs, par exemple, provenant de trois chiens, fournirent un bel anneau de près d'un dixième de milligramme d'arsenic ¹.

1. Employé pour la destruction : 400 grammes du mélange acide.

50 grammes de corne de bœuf, pulvérisée au laboratoire, donnèrent même l'énorme proportion de deux dixièmes et demi de milligramme d'arsenic, c'est-à-dire de cinq milligrammes de ce métalloïde par kilogramme¹.

Mais, comme tous ces objets d'étude, malgré les précautions dont je m'entourais, ne présentaient pas encore pour moi toute la sécurité désirable, je m'adressai à M. Nocard. Le distingué professeur de l'école d'Alfort voulut bien m'envoyer des pièces provenant d'un veau, âgé d'un mois, né à l'Ecole vétérinaire, et d'une génisse de 18 mois, d'origine connue, achetée très jeune, et élevée également dans ses écuries d'étude.

Les résultats obtenus avec les poils et les ongles de ces deux animaux, mais surtout avec les cornes de la génisse, furent tout à fait positifs. Vingt grammes de substance, dont la destruction exigeait seulement une soixantaine de grammes du mélange acide, suffirent dans tous les cas pour obtenir des anneaux très nets d'arsenic.

Celui qui provenait des cornes représentait environ deux centièmes de milligramme, soit cent fois davantage que n'en contenaient les réactifs employés.

La peau et même le foie² fournirent aussi des traces de métalloïde (quelques millièmes de milligramme). D'une manière générale, les tissus de la génisse étaient plus riches que les tissus correspondants du veau. Il semble qu'il y ait accumulation d'arsenic avec l'âge, car les cornes du bœuf étaient à leur tour, comme on peut s'en rendre compte par les chiffres indiqués plus haut, beaucoup plus riches que celles de la génisse. Il semble aussi, en comparant la série des expériences, que les poils noirs soient plus riches que les poils blancs. Il serait curieux d'examiner si les tissus kératiniques représentent une réserve d'arsenic et si les cellules pigmentophages, découvertes par M. Metchnikoff³, jouent un rôle dans les migrations de cet élément à travers l'organisme.

Je puis ajouter encore une preuve convaincante de l'existence normale de l'arsenic dans l'organisme. Grâce à l'obligeance de

1. Employé pour la destruction : 465 grammes du mélange acide.

2. Le foie est très facile à détruire : pour 50 grammes, on employait seulement 5 grammes d'acide sulfurique et 50 grammes du mélange acide. Pour la peau, on a pris le double de ces quantités.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XV, p. 865-979 (1901).

S. A. S. le prince de Monaco, j'ai pu examiner des glandes thyroïdes provenant de phoques (*Phoca barbata*), capturés au voisinage du Spitzberg, dans des conditions, par conséquent, où on ne peut même pas invoquer la contamination industrielle de l'atmosphère respirée par les animaux. Cinquante grammes de ces glandes, attaquées par 75 grammes de mélange acide et 10 grammes d'acide sulfurique, ont donné un anneau très net, d'au moins un centième de milligramme.

Je n'insisterai pas trop, en terminant, sur les variations de la teneur en arsenic que paraissent éprouver les glandes thyroïdes quand on compare les résultats de M. Armand Gautier avec ceux obtenus par Hödlmoser, Ziemke, Cerny et moi-même. J'estime, en effet, que les dosages de quantités aussi minimes d'arsenic sont si délicates, que les comparaisons ne peuvent être faites utilement que par un même observateur, bien en possession de la méthode.

La seule conclusion qu'on puisse alors retenir à ce sujet est uniquement d'ordre qualitatif. Or, les contradicteurs mêmes de M. Armand Gautier ont signalé, l'un dans plusieurs de ses essais, l'autre dans presque tous, l'apparition de traces arsenicales. La crainte, très légitime d'ailleurs, d'avoir introduit ces traces au cours des opérations, a pu seule empêcher ces savants de conclure avec certitude en faveur de l'existence de l'arsenic dans l'organisme.

Après mes expériences, cette crainte ne peut plus, je crois, persister. La richesse des tissus kératiniques en arsenic est tellement au-dessus, dans certains cas, des erreurs expérimentales, qu'il ne reste plus qu'à envisager l'importance et le rôle physiologique de cet intéressant métalloïde.

RECHERCHES SUR LE PHÉNOMÈNE DE L'AGGLUTINATION

Variabilité de l'aptitude agglutinative et de la fonction agglutinogène. — Leurs relations entre elles ; leurs rapports avec la mobilité des microbes.

PAR MM. CHARLES NICOLLE ET M. TRENEL (DE ROUEN).

L'*aptitude agglutinative* (agglutinabilité) est une propriété très commune chez les êtres vivants unicellulaires. Nous connaissons aujourd'hui un grand nombre de microbes et de cellules libres qui présentent la propriété de se réunir en amas sous l'influence d'agents divers ; il paraît même probable qu'à un degré évidemment variable tous les microbes et toutes les cellules libres jouissent de propriétés analogues.

L'agglutination des éléments sensibles peut être réalisée par des substances très diverses : composés chimiques en solution ; produits de l'activité des microbes¹ ; sérums normaux ; sérums spécifiques provenant d'organismes animaux infectés spontanément ou inoculés avec des cellules, microbes, produits cellulaires ou produits microbiens. Ces sérums sont les corps qui présentent au plus haut point la propriété agglutinante.

La *fonction agglutinogène* semble aussi répandue que l'aptitude agglutinante. Nous savons en effet qu'il est presque toujours possible de provoquer dans les humeurs des animaux inoculés avec des microbes ou des cellules l'apparition d'un pouvoir agglutinant vis-à-vis de ces éléments.

Mais si l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène paraissent constituer des propriétés inhérentes à toutes ou presque toutes les cellules libres, microbiennes ou non, ces deux propriétés offrent des différences considérables suivant qu'on les étudie sur tel ou tel de ces éléments. Ces différences sont si marquées qu'elles pourraient tromper un observateur superficiel. Quel rapport, en effet, semble-t-il exister à première vue entre le phénomène de l'agglutination du bacille typhique de

1. C. NICOLLE, *Soc. de Biologie*, 12 novembre 1898 ; MALVOZ, ces *Annales*, 25 août 1899.

nos laboratoires par le typhosérum, dont une goutte peut précipiter mille, dix mille et même un million de fois son volume de culture ¹, et l'action si incertaine de certains sérums spécifiques capables seulement d'agglutiner les cellules ou les microbes correspondants lorsqu'ils sont ajoutés à ceux-ci à dose égale ou manifestement supérieure?

Cette différence vraiment énorme dans l'intensité d'un même phénomène est un fait d'une importance très grande. Si une explication en peut être donnée, la connaissance du mécanisme du phénomène de l'agglutination en sera certainement éclaircie.

Nous retrouvons, d'ailleurs, des variations analogues, lorsqu'au lieu de comparer, au point de vue des propriétés agglutinable et agglutinogène, microbes et cellules d'espèces différentes, nous étudions diverses races ou divers échantillons d'une espèce microbienne.

C'est là un fait qui commence à être bien connu pour certains microbes, en particulier pour le bacille typhique. L'existence de races ou d'échantillons de bacille d'Éberth peu ou pas sensibles à l'action du sérum typhique (bacilles typhiques inagglutinables) domine aujourd'hui le problème de l'analyse bactériologique des eaux. Comment distinguer d'espèces voisines, mais banales, et sans intérêt au point de vue de l'hygiène, un bacille typhique légitime auquel manque la propriété la plus caractéristique de ce microbe? La connaissance des causes qui font varier l'agglutinabilité du bacille d'Éberth rendra plus facile le diagnostic de ses formes anormales.

Par ce que nous connaissons du bacille typhique, mieux étudié à ce point de vue que les autres bactéries, nous savons que la fonction agglutinogène varie tout autant que l'agglutinabilité suivant que l'on considère tel ou tel échantillon de ce microbe.

Enfin, les cultures successives d'un même microbe offrent souvent des différences considérables au point de vue de son agglutinabilité. Là encore, c'est principalement l'étude du bacille typhique qui nous a fait connaître ces variations; un échantillon de bacille d'Éberth, primitivement peu sensible à l'action du sérum, le devient de plus en plus en vieillissant.

1. VAN DE VELDE, *Soc. de Biologie*, 9 octobre 1897.

Nos expériences personnelles confirment cette grande variabilité des propriétés agglutinative et agglutinogène signalée déjà par les auteurs pour les diverses espèces microbiennes et pour les races ou échantillons d'origines différentes d'une même espèce, ainsi que la sensibilité variable à l'action du sérum des cultures successives d'un même microbe.

Elles nous ont, en outre, permis de mettre en évidence, ce qui n'avait pas été fait avant nous, les variations du pouvoir agglutinogène d'un même microbe placé dans des conditions de culture différentes.

Les plus importantes de ces expériences seront relatées au cours de notre travail.

Nous nous sommes limités dans nos recherches à l'étude des conditions et des causes de la variabilité des propriétés agglutinative et agglutinogène chez les microbes, et nous avons laissé de côté la partie du problème qui concerne l'agglutination des cellules libres de l'organisme. Ces éléments paraissent se comporter à ce point de vue de la même manière que les microbes faiblement agglutinables et faiblement agglutinogènes.

*
* *

VARIABILITÉ DE L'APTITUDE AGGLUTINATIVE CHEZ LES DIFFÉRENTES ESPÈCES MICROBIENNES; CHEZ LES ÉCHANTILLONS D'UNE MÊME ESPÈCE; CHEZ UN MÊME MICROBE DANS LES DIVERSES CONDITIONS DE SA VIE. — RAPPORT DE CES VARIATIONS AVEC LA MOBILITÉ DES MICROBES

1° *Variabilité de l'aptitude agglutinative chez les différentes espèces microbiennes.* — Il existe, au point de vue de leur aptitude à se mettre en amas sous l'influence des sérums spécifiques, les différences les plus considérables entre les diverses espèces microbiennes. Nous avons déjà signalé ce fait. Pour en trouver une explication, il nous paraît utile de parcourir rapidement la liste des microbes fortement ou faiblement agglutinables étudiés par les auteurs et par nous-mêmes.

Les microbes qui, suivant les auteurs, présentent au plus haut degré l'aptitude agglutinative sont : le bacille typhique, les diverses races du *B. coli*, les microorganismes voisins de ces deux espèces (bacilles éberthiformes ou coliformes), le bacille de la psittacose, les vibrions cholériques ou cholérifor-

mes, le *Proteus vulgaris*, le pyocyanique. On peut dire que ces microbes offrent une sensibilité extrême à l'action des agglutinines spécifiques; il suffit d'une trace de ces substances pour les mettre en amas; et l'intensité du phénomène, lorsqu'il s'agit d'échantillons types de ces microbes, semble dépendre moins de leur sensibilité au réactif, laquelle est toujours extrême, que des variations du sérum employé (que ce sérum provienne d'individus ou d'animaux infectés spontanément, ou que ce soit un sérum expérimental).

Infiniment moins sensibles, et d'une sensibilité souvent variable suivant les échantillons examinés ou les conditions de vie d'un même échantillon, sont les microbes suivants : bacille du tétanos, vibrion septique, *B. Chauvvi*, bacille tuberculeux, bacilles de la diphtérie, du charbon, de la morve, de la peste, champignon du muguet et quelques autres. Il faut parfois, pour les agglutiner, employer des sérums expérimentaux très actifs (sérums antitoxiques du tétanos, de la diphtérie, etc.). Le sérum de l'homme ou des animaux infectés spontanément n'a sur eux qu'une action faible, incertaine ou nulle.

D'autres microbes enfin se montrent d'une sensibilité si légère à l'action des sérums spécifiques qu'il semble, pratiquement au moins, qu'ils y soient parfaitement réfractaires. Tels sont, pour en citer seulement quelques-uns, le bacille de l'influenza, le meningocoque, le bacille de Friedlander, le bacille de Fritsch, etc.

Nos expériences personnelles confirment, pour un certain nombre de ces microbes, les données des auteurs. Entre nos mains, le bacille typhique des laboratoires, plusieurs races de *B. Coli*, le bacille de la psittacose, les vibrions cholériques, le pyocyanique se sont montrés d'une sensibilité parfaite vis-à-vis des sérums correspondants. Il en a été de même du b. cyanogène sur lequel nous croyons avoir été les premiers à expérimenter et qui s'agglutine très facilement sous l'action du sérum d'un lapin inoculé avec ses cultures.

Nous n'avons, au contraire, obtenu que très difficilement l'agglutination du bacille tétanique par l'action du sérum d'une poule inoculée avec des doses considérables de cultures tétaniques. Et, d'autre part, le bacille de Friedlander et le bacille diphtérique n'ont été nullement impressionnés par le sérum

d'animaux infectés avec ces microbes (cobaye et lapin pour le bacille de Friedlander, rat ayant reçu des quantités très considérables de cultures pour le bacille diphtérique), même en employant ces sérums à la dose d'une partie pour une partie de culture¹.

L'explication de cette grande variabilité de l'aptitude agglutinative dans la série des espèces microbiennes nous paraît simple. Le bacille typhique, le *B. Coli*, le bacille de la psittacose et les bactéries voisines, les vibrions cholériques et cholériformes, le pyocyanique, le b. cyanogène, le *Proteus* sont des microbes d'une mobilité parfaite et ciliés. Le bacille tuberculeux, les bacilles du tétanos et du charbon symptomatique, le vibrion septique ne sont que faiblement mobiles, et dans des conditions particulières de leur développement. Les autres microbes ne présentent aucune mobilité.

Si l'on considère les diverses espèces microbiennes étudiées jusqu'à ce jour, l'aptitude agglutinative paraît donc en rapport avec la mobilité. Les microbes très mobiles sont très agglutinables; les microbes peu ou point mobiles sont peu ou point sensibles à l'action des sérums spécifiques. C'est là un fait qu'il convient de retenir;

2^o *Variabilité de l'aptitude agglutinative des races ou échantillons d'une même espèce microbienne.* — Certains microbes, parmi ceux qui sont sensibles à l'action des sérums spécifiques, présentent des variations dans leur aptitude agglutinative, suivant qu'on examine tel ou tel échantillon ou telle et telle race. Le fait est bien connu en ce qui concerne le bacille typhique. Les auteurs ont décrit, principalement dans les eaux, des races peu ou point agglutinables de ce microbe. Il est possible que dans ces cas, la perte de l'aptitude agglutinative soit définitive et qu'il s'agisse bien là de races particulières caractérisées avant tout par l'absence de cette propriété. Mais il se peut également que la perte de l'agglutinabilité ne soit chez ces microbes qu'un phénomène transitoire, et que soit spontanément, soit expérimentalement, l'aptitude agglutinative leur puisse être restituée. Toutes les fois que l'étude d'un bacille typhique inagglutinable a pu être prolongée pendant un certain temps, l'aptitude agglutinative, d'abord absente, s'est peu à peu régénérée.

1. Voir C. NICOLLE, ces *Annales*, 1898, p. 186 et suivantes.

L'existence de races définitivement inagglutinables n'est donc point absolument démontrée ; aussi, jusqu'à nouvel ordre, la question des variations de l'aptitude agglutinative du bacille typhique, suivant les échantillons examinés, nous paraît-elle se confondre avec celle des variations de l'agglutinabilité d'un même échantillon de ce microbe examiné dans les différentes conditions de sa vie.

Et ce que nous disons du bacille typhique peut également se dire, jusqu'à nouvel ordre, des autres espèces microbiennes, moins bien connues à ce point de vue que le bacille d'Eberthi.

3° *Variabilité de l'aptitude agglutinative d'un même microbe dans les diverses conditions de sa vie.* — Deux microbes seulement ont été étudiés jusqu'à présent à ce point de vue : le bacille tuberculeux et le bacille typhique¹.

MM. Arloing et P. Gourmont ont montré que le bacille tuberculeux, insensible dans les conditions ordinaires de sa vie saprophyte à l'action des divers sérums tuberculeux, pouvait être agglutiné par ceux-ci lorsqu'on le cultive dans des conditions spéciales, et ils ont indiqué la technique à suivre pour arriver à ce résultat. Dans les cultures homogènes, utilisées depuis leurs travaux pour le séro-diagnostic de la tuberculose, le bacille de Koch se présente sous forme de bacilles parfaitement isolés les uns des autres et *mobiles*. En même temps qu'il est devenu mobile, le bacille tuberculeux est devenu agglutinable. Mobilité et agglutinabilité vont donc absolument de pair dans ce cas encore, et, phénomène intéressant que nous retrouverons à propos du bacille typhique, l'aptitude agglutinative s'est de plus en plus développée pour ce microbe à mesure que des cultures successives en ont été faites dans des conditions appropriées ; si bien que l'échantillon de MM. Arloing et P. Gourmont est devenu de plus en plus sensible à l'action du sérum des tuberculeux.

1. On pourrait leur adjoindre la bactérie charbonneuse ; M. Malvoz a montré, en effet, que le vaccin charbonneux présentait à la fois une légère mobilité et une sensibilité manifeste aux agglutinines spécifiques sécrétées par le bacille du charbon dans ses cultures. (Ces *Annales*, 25 août 1899.) Il serait intéressant de rechercher si certaines des espèces bactériennes agglutinables regardées comme immobiles n'acquiescent pas dans leurs cultures successives une légère mobilité, laquelle expliquerait leur agglutinabilité ; à ce point de vue, l'étude du bacille de la morve serait peut-être la première à entreprendre, étant donnée la sensibilité de ce microbe aux agglutinines des sérums normaux ou spécifiques.

On croyait autrefois que le bacille typhique présentait, quelle qu'en soit l'origine, une sensibilité à peu près égale à l'action du sérum spécifique. Il est démontré aujourd'hui qu'il n'en est rien; des échantillons nombreux, peu ou pas sensibles à l'action des agglutinines, ont été isolés par divers auteurs de l'organisme des malades atteints de fièvre typhoïde ou des eaux.

Ce sont Kolle, Johnson et Tuggart, Van de Velde, Rodet qui ont fait les premières constatations à cet égard.

M. Sacquépée, en 1901, a isolé trois échantillons de bacilles d'Éberth inagglutinables de la rate de malades morts de la fièvre typhoïde, et trois autres de l'eau. Ces échantillons ont récupéré en trois mois, par simple vieillissement, leur aptitude agglutinative ¹.

M. Rémy ², au moyen de la méthode qu'il préconise, a isolé des eaux des microorganismes semblables; MM. Cambier ³, Emery ⁴, ont fait des constatations analogues. Les microbes isolés par ces auteurs ont récupéré peu à peu, par des cultures successives, leur agglutinabilité d'abord faible ou absente.

M. Rehns ⁵ a trouvé, dans une autopsie, un bacille typhique un tiers de fois moins agglutinable que l'échantillon de laboratoire type sur lequel il opérait.

Sur 9 échantillons de bacille d'Éberth isolés par lui du sang des typhiques pendant la vie, M. J. Courmont ⁶ en a trouvé 8 dont l'aptitude agglutinative lui a paru inférieure d'un quart environ à celle d'un bacille typhique type de son laboratoire.

M. Bancel ⁷ a trouvé dans trois suppurations d'origine typhique (abcès de la rate, périostite de l'humérus, ostéomyélite du fémur) trois échantillons de bacille d'Éberth primitivement insensibles à l'action du sérum typhique expérimental et à celle du propre sérum des malades; ces échantillons ont récupéré leur aptitude agglutinative après 6 à 11 mois de culture sur les milieux artificiels.

Aucun de ces auteurs n'a donné de renseignements sur la plus ou moins grande mobilité de ces échantillons peu ou point

1. Ces *Annales*, 25 avril 1901.

2. Ces *Annales*, 25 mars 1901.

3. *Revue d'hygiène*, janvier 1902.

4. *Revue d'hygiène*, février 1902.

5. *Soc. de biologie*, 21 décembre 1901.

6. *Journal de physiologie et de pathologie générale*, janvier 1902.

7. *Société médicale des hôpitaux de Lyon*, 14 mars 1902.

agglutinables. Dans certains travaux, publiés sur les analyses d'eaux, il est bien noté quelquefois que les bacilles typhiques isolés par telle ou telle méthode (celles de Peré, de Vincent principalement) sont peu ou pas mobiles ; mais nulle part dans ces travaux, dont la plupart sont d'ailleurs anciens, il n'est fait allusion à un rapport quelconque entre l'immobilité des microbes isolés et la pauvreté ou l'absence de leur aptitude agglutinative¹.

Un seul auteur, M. Sacquépée², a, jusqu'à présent, cherché à créer expérimentalement des races de bacille typhique inagglutinables ; il y est parvenu en cultivant pendant 3 mois le bacille d'Eberth dans des sacs de collodion inclus dans la cavité péritonéale de rats fortement immunisés vis-à-vis du bacille typhique. Cet auteur ne nous dit pas si le bacille devenu inagglutinable avait perdu totalement ou partiellement sa mobilité.

Nos études personnelles ont porté sur deux points : nous avons, d'une part, recherché quelle était la sensibilité, vis-à-vis d'un sérum typhique connu, d'échantillons nombreux de bacille d'Eberth isolés par nous de la rate de malades morts de fièvre typhoïde. D'autre part, nous nous sommes attachés à modifier expérimentalement l'aptitude agglutinative d'un bacille typhique extrêmement sensible à l'action des agglutinines.

Dix rates de typhiques ont été étudiées par nous³. Les résultats ont été les suivants :

RATE B (enfant). Isolement de 5 colonies de bacille typhique. Soumis à l'action d'un sérum expérimental très actif, trois de ces échantillons se montrent d'une sensibilité égale à celle d'un bacille typhique type de laboratoire. Deux sont un peu moins sensibles ; mais la différence est faible, et ne se traduit que par un retard de quelques minutes dans la production des amas.

RATE F (enfant). Isolement de 5 colonies de bacille typhique. Examinées

1. Des faits analogues ont été notés également à propos d'échantillons de bacilles d'Eberth isolés du sang des typhiques. TEISSIER (*Archives de méd. exp.* 1893, juillet), COLE (*Johns Hopkins Hosp. reports*, 1901, juillet), BESQUET (*Revue méd.*, 21 juin 1902), en particulier, ont montré la moindre mobilité des bacilles typhiques isolés dans ces cas.

2. Ces *Annales*, 25 novembre 1901.

3. Dans toutes nos expériences, nous avons opéré sur des cultures en bouillon peptoné de 24 heures. Ces cultures ont été laissées en contact avec le sérum pendant une heure à la température du laboratoire. La recherche de l'agglutination a été faite au bout de ce temps à l'œil nu et au microscope.

comme les précédentes, elles se montrent aussi agglutinables que la culture témoin.

RATE L (enfant). 5 *échantillons* isolés; même résultat.

Dans ce cas comme dans les deux cas précédents, la mobilité des microbes n'avait pas été notée.

RATE P (adulte). 26 *colonies* sont isolées et étudiées. Les bacilles typhiques sont parfaitement mobiles en culture. Avec un sérum expérimental actif à 1/100, l'agglutination se fait pour un bacille typhique de laboratoire en 10 minutes; elle est complète en 25 minutes. Vingt-trois de nos échantillons se comportent de même; trois présentent un retard minime.

RATE M (adulte). 1 *échantillon* de bacille typhique isolé dans ce cas et mobile, examiné dans les mêmes conditions, offre un léger retard dans son agglutination par rapport au bacille typhique témoin. Le sang du malade prélevé dans la période d'état de la maladie est également actif sur ces deux microbes à 1/10; le sang prélevé la veille de la mort se montre actif à 1/10 sur le bacille typhique M et à 1/30 pour le bacille témoin.

RATE C (adulte). 1 *échantillon* isolé se montre d'une sensibilité égale à celle du bacille typhique témoin pour un sérum expérimental actif à 1/100. Il est parfaitement mobile.

RATE J (adulte). 1 *échantillon* est isolé, il est mobile. Même résultat.

RATE P (adulte). 10 *échantillons* sont isolés; mobilité parfaite. Même résultat.

RATE T (adulte). 6 *colonies* isolées de la rate et ensemencées en bouillon ordinaire sont soumises, comparativement à un bacille typhique type, à l'action d'un sérum d'âne actif à 1/5000. Deux des échantillons donnent des amas très petits à 1/1; quatre agglutinent à 1/1, mais pas au-dessus. Le sérum du malade, actif à 1/100 sur le bacille typhique type, agglutine très faiblement à 1/1 quatre de ces échantillons, il se montre sans aucune action sur les deux autres. Ces six échantillons offrent une mobilité nulle ou douteuse.

Des réensemencements de nos cultures, en bouillon ordinaire, pratiqués après 18 et 19 jours, présentent une sensibilité variant de 1/500 à 1/1.000 avec le sérum d'âne actif à 1/5000 pour le bacille typhique témoin. Les cultures primitives elles-mêmes, après 19 jours, présentent une agglutinabilité analogue.

En même temps qu'on ensemait en bouillon ordinaire aérobie les six colonies isolées de la rate, une *septième colonie* avait été portée directement en bouillon anaérobie. Au bout de 18 jours, cette colonie est repiquée en bouillon ordinaire aérobie; l'agglutinabilité de la culture obtenue est de 1/5000 avec le même sérum d'âne.

Vingt-cinq jours après l'autopsie, un isolement nouveau est pratiqué avec une trace de la pulpe de la rate conservée dans une pipette stérile, les 3 cultures obtenues sont agglutinables à 1/1000 avec le même sérum.

L'aptitude agglutinogène, absente ou très faible au début, s'est donc régénérée avec une grande rapidité. En même temps, dans tous les cas, la mobilité a reparu.

RATE D (adulte). 1 *colonie* est isolée de la rate et ensemencée en bouillon

ordinaire; le bacille typhique est très faiblement mobile. Le sérum d'âne actif à 1/5000 sur le bacille témoin agglutine cette culture à 1/10 seulement. Une culture fille de cette culture, pratiquée le jour même, est agglutinable à 1/100 par le même sérum.

Quatre jours après l'autopsie, un nouvel isolement est fait avec une trace de la pulpe de rate conservée dans une pipette stérile; les colonies isolées sont agglutinables à 1/1000 par le même sérum d'âne; elles sont mobiles. Comme dans le cas précédent, l'aptitude agglutinative et la mobilité, d'abord absentes, sont réapparues rapidement.

D'une manière générale, ces expériences confirment les données des auteurs. Le bacille typhique, isolé récemment de la rate de l'homme, se montre le plus souvent parfaitement sensible à l'action du sérum spécifique; mais dans un certain nombre de cas, cette sensibilité est ou très affaiblie ou nulle.

Elle se régénère rapidement dans les cultures successives; quelquefois même sa réapparition est subite dès la première culture, peu agglutinable à la seconde, très sensible à l'action des agglutinines.

Toutes les fois que notre attention a été attirée de ce côté, nous avons remarqué la parfaite mobilité des bacilles typhiques agglutinables et la mobilité nulle ou douteuse des bacilles inagglutinables. Lorsque ceux-ci récupèrent leur aptitude agglutinative, la mobilité réparaît en même temps.

Nous avons cherché, d'autre part, à modifier expérimentalement l'agglutinabilité d'un échantillon de bacille typhique parfaitement sensible à l'action du sérum spécifique dans le but de créer une race de bacilles d'Eberth dépourvue de l'aptitude agglutinative.

Le passage par l'organisme d'animaux sensibles (cobayes, Lapins) ne nous a donné aucun résultat. Les bacilles typhiques isolés du sang des animaux inoculés se sont montrés, même après un grand nombre de passages, aussi sensibles à l'action d'un sérum étalon qu'au début de nos expériences.

Dans un cas cependant, la perte de la propriété agglutinable s'est produite. Ce cas mérite d'être relaté.

Un cobaye est inoculé, le 25 février 1901, dans la plèvre avec 1/4 de c. c. d'une culture de bacille typhique, âgée de 7 jours, en bouillon spécial servant à l'un de nous pour la préparation de la toxine soluble du microbe. Cette culture est mobile et très agglutinable. Le cobaye meurt le 2 mars. A l'autopsie, on ne trouve aucune lésion pleurale, la rate et les capsules surré-

nales sont un peu grosses, l'intestin est normal, les poumons congestionnés. La vésicule biliaire, très distendue, contient un liquide purulent. Les tubes de cultureensemencés avec le sang demeurent stériles. Une trace du pus de la vésicule portée sur gélose donne lieu au développement de colonies de bacilles d'Eberth. Trois de ces colonies sont ensemencées en bouillon; les cultures obtenues ne s'agglutinent qu'au bout de plusieurs heures à 1/10 sous l'action d'un sérum typhique expérimental actif à 1/2000. Les bacilles typhiques n'offrent qu'une mobilité douteuse.

Ces trois cultures mises en pipettes sont réensemencées en bouillon après 10 mois. Les cultures filles ont récupéré leur aptitude agglutinative; un sérum typhique expérimental actif à 1/1500 sur un bacille typhique type, les agglutine à 1/500 environ. La mobilité est parfaite.

Le vieillissement ne nous a pas donné de résultats appréciables. Nous avons examiné quelle était l'agglutinabilité de sept échantillons de bacilles typhiques légitimes et bien agglutinables ayant séjourné en pipettes pendant quatre ans. Les cultures filles obtenues, avec les réensemencements en bouillon de ces sept échantillons, se sont montrées sensiblement aussi agglutinables, par l'action d'un sérum expérimental, qu'une culture étalon; dans un seul cas, il y a eu un retard manifeste dans l'agglutination.

Le procédé qui nous a permis d'obtenir le plus facilement un amoindrissement de l'aptitude agglutinante est la culture à 42°. A cette température, le bacille typhique se développe en bouillon ordinaire en donnant un trouble léger; il ne pousse ni sur les milieux solides, ni en solution de peptone (d'une façon appréciable tout au moins). Si la température s'élève un peu au-dessus de 42°, il n'y a pas de développement apparent. La vitalité du microbe à l'étuve à cette température est courte; au bout de 3 à 4 jours généralement, les réensemencements deviennent stériles. Il faut donc repiquer les cultures tous les jours, ou tout au moins tous les deux jours.

Nous avons cultivé à la température de 42°, 2 échantillons de bacilles typhiques légitimes bien agglutinables et mobiles, d'origines différentes. Les résultats obtenus ont été sensiblement les mêmes.

ÉCHANTILLON n° 1. — L'échantillon n° 1, examiné au début de l'expérience avec un sérum étalon, est agglutiné à 1/1000 par ce sérum. Au 13^e passage à 42°, il n'est plus agglutinable qu'à 1/10 et très faiblement, sa mobilité est douteuse. (Une culture fille de cette culture du 13^e passage à 42°, mise à

l'étuve à 36°, s'agglutine à 1/30 sous l'action du même sérum.) L'étuve ayant baissé aux environs de 40° pendant 48 heures, l'agglutinabilité s'est en partie récupérée aux 18° et 19° passages (à ce dernier passage, le même sérum donne une agglutination à 1/100); elle s'est ensuite atténuée à nouveau, l'étuve ayant été maintenue à 42°, mais sans disparaître complètement. Au 34° passage (le dernier pratiqué), un sérum actif à 1/3000 pour le bacille typhique étalon donne avec cette culture des amas petits à 1/3, de très petits amas à 1/10, rien au-dessus; la mobilité est nulle ou douteuse.

ÉCHANTILLON n° 2. — L'échantillon n° 2 a été isolé de la vésicule biliaire d'un cobaye mort de septicémie éberthienne expérimentale; il est d'une agglutinabilité parfaite. Le sérum étalon agit sur lui à 1/3000. Au 1^{er} passage à 42°, l'agglutinabilité est déjà tombée à 1/100; au 2^e passage à 41/10 environ; il n'est plus ou presque plus mobile. L'agglutinabilité ne s'est pas modifiée ultérieurement jusqu'au 23^e passage à 42° (le dernier pratiqué); des mensurations faites de temps en temps ont montré des écarts variant de 1/3 à 1/20 sous l'action du même sérum étalon — ces variations doivent être attribuées à des oscillations légères de la température de l'étuve.

Au même jour, nous arrêtons les passages à 42° de ces 2 échantillons à peu près également inagglutinables, et nous en faisons des cultures successives en bouillon ordinaire à 36° (repiquage pratiqué chaque jour).

Au 1^{er} passage à 36°, le sérum étalon (actif à 1/3000) agglutine l'échantillon 1 à 1/200, l'échantillon 2 à 1/100; la mobilité est déjà réapparue dans les deux cultures.

Au 2^e passage, le taux de l'agglutinabilité est de 1/1000 pour l'échantillon 1, de 1/300 pour l'échantillon 2.

Au 3^e passage, résultat sensiblement égal.

Au 5^e passage, l'échantillon 1 s'agglutine à 1/2000 environ, l'échantillon 2 à 1/700. Il est à noter que la culture en bouillon de l'échantillon 2 s'est montrée, à tous les passages, à peu près deux fois moins abondante que la culture de l'échantillon 1, ce qui indique un retour à peu près égal de la sensibilité à l'agglutinine pour les deux échantillons.

Au 5^e passage, la mobilité des deux cultures est parfaite. — Nous n'avons pas poussé plus loin nos recherches.

Ces expériences montrent qu'il est très facile d'atténuer à l'extrême l'aptitude agglutinative du bacille typhique en faisant les cultures de ce microbe à 42°. A cette température, l'agglutinabilité baisse très rapidement; après quelques passages, elle est tout à fait amoindrie. Elle ne disparaît cependant pas entièrement, et il suffit de quelques cultures en série à 36° pour la restituer presque complètement. La mobilité du microbe disparaît ou reparaît en même temps.

Si intéressants que fussent ces résultats, ils ne nous donnaient

pas entière satisfaction. Le but de nos recherches était de trouver une race [de bacille typhique définitivement privée de l'aptitude agglutinative, sur laquelle nous puissions expérimenter à notre aise et rechercher, par comparaison avec une race de même origine, mais bien agglutinable, les rapports existant entre l'aptitude agglutinative, la fonction agglutinogène et la mobilité. Nos isolements de bacilles typhiques de la rate, comme nos tentatives de création de races inagglutinables, ne nous avaient donné que des échantillons temporairement privés (et jamais d'une façon absolument complète) de la sensibilité aux agglutinines. Il nous était impossible d'expérimenter sur elles puisque, du jour au lendemain, l'aptitude agglutinative très atténuée pouvait être récupérée presque totalement.

Nos recherches se trouvaient donc arrêtées, lorsque le hasard mit entre nos mains l'échantillon microbien que nous avons cherché sans succès à créer.

Cet échantillon n'est pas, ainsi que nous l'avons cru pendant un certain temps, une race particulière du bacille typhique, mais un microbe pathogène très voisin. Nous lui conserverons ici le nom que nous lui avons primitivement donné de *bacille T C*.

Il nous paraît intéressant de rapporter ici brièvement l'histoire de ce microbe.

Depuis plus d'un an, l'un de nous pratiquait alternativement des passages d'un bacille typhique, légitime, mobile et bien agglutinable, par l'organisme animal et par des milieux de culture spéciaux destinés à la production de la toxine soluble du bacille d'Éberth. Un cobaye inoculé dans la plèvre avec 6 gouttes d'une de ces cultures âgée de 4 jours meurt en 9 jours; à son autopsie, nous trouvons la vésicule biliaire distendue par un liquide purulent, comme dans le cas du cobaye atteint de cholécystite typhique relaté plus haut¹. — Un isolement est pratiqué de suite avec ce pus sur gélose et nous donne deux colonies, qui, repiquées en bouillon, se montrent à la fois immobiles et inagglutinables à 1-2 par l'action d'un sérum typhique expérimental actif à 1/10.000. Au point de vue morphologique, comme au point de vue des caractères de culture, le microbe isolé est identique au bacille typhique. Son immobilité et son inagglutinabilité persistent dans les cultures successives faites à une température de 23°, puis de 36° (les repiquages étant pratiqués d'abord tous les jours, ensuite tous les deux jours). A cette température, les cultures en bouillon sont peu abondantes;

1. On se rappelle que dans ce cas nous avons isolé un bacille typhique très peu agglutinable.

elles le sont devenues un peu plus dans la suite, mais sans atteindre jamais l'abondance de cultures typhiques ordinaires. Nous pensions alors avoir en notre possession un échantillon de bacille typhique inagglutinable et nous cherchâmes à la fois à conserver ce caractère à certaines cultures et à développer chez d'autres l'aptitude agglutinative absente jusque-là. Nous sommes parvenus facilement à ce double résultat en faisant des cultures à des températures différentes. Conservé et repiqué à 25°-35°, notre microbe est resté jusqu'à présent ce qu'il était primitivement, c'est-à-dire immobile et insensible à l'action du sérum spécifique (nous verrons plus loin comment nous sommes arrivés à préparer ce sérum). Au contraire, cultivé et repiqué à une température de 18° à 20°, il ne tarda pas à présenter une mobilité d'abord faible, puis de plus en plus nette, en même temps qu'une sensibilité de plus en plus grande à l'action du sérum spécifique.

La première culture à 20°, venant d'une des cultures primitives, conservée en pipette depuis 2 mois, était encore immobile. — La seconde culture présentait déjà une mobilité très faible — Pensant que nous avions affaire à un échantillon de bacille typhique, nous fîmes agir sur elle un sérum typhique expérimental actif à 1/300; ce sérum donna quelques amas à 1/1, rien au-dessus. Le même sérum, essayé plus tard, à plusieurs reprises, sur des cultures de passage à 20°, de plus en plus mobiles et finalement d'une mobilité parfaite ne se montra pas sensiblement plus actif vis-à-vis d'elles. Ce résultat, en complet désaccord avec nos expériences antérieures, nous amena alors à penser que notre microbe, malgré sa grande analogie avec lui et malgré son origine, n'était pas le bacille typhique. La preuve nous en fut donnée rapidement par l'expérience suivante : un lapin inoculé avec une culture de ce microbe mobile fournit un sérum agglutinant pour ce microbe dans sa forme mobile, inactif sur ce même microbe dans sa forme immobile et aussi sur le bacille typhique¹.

A la suite de ces expériences, nous nous sommes donc trouvés avoir entre nos mains deux variétés différentes d'un même microbe, provenant toutes les deux de la même culture originelle et conservant, dans des conditions de culture différentes, leurs caractères spéciaux :

Une première variété immobile, inagglutinable par l'action du sérum spécifique, produit par l'inoculation aux animaux de cultures vivantes de la variété mobile. (Nous verrons plus loin

1. Les caractères de ce microbe se sont peu à peu modifiés par les cultures successives. Immédiatement après son isolement, il présentait les caractères de culture du bacille typhique, en particulier le faible développement en gélatine et sur pomme de terre, l'absence de production d'indol et d'action sur le lactose. Après une cinquantaine de passages, le développement sur pomme de terre et en gélatine est devenu plus abondant, et le microbe a commencé à donner de l'indol. Cette réaction peu nette pour les cultures faites à 35° est évidente pour celles à 18°-20°.

La virulence (voir plus loin) ne s'est pas modifiée par les cultures successives.

que cette variété inagglutinable est également inagglutinogène.)

Une seconde variété mobile, sensible à l'action du sérum spécifique; représentant probablement le microbe sous sa forme ancestrale, l'immobilité n'étant, suivant toute apparence, qu'un caractère de dégradation dû au passage par l'organisme animal.

La possibilité de conserver indéfiniment à ces deux variétés leurs caractères différentiels, en les cultivant aux températures respectives de 18 à 20° et de 25 à 35°, nous a permis non seulement de nous rendre compte, d'une façon encore plus manifeste, que dans nos expériences antérieures, des relations qui existent entre l'aptitude agglutinative d'un microbe et sa mobilité, mais encore de saisir les rapports intimes qui relient pour un même microbe la fonction agglutinogène à l'aptitude agglutinative ¹.

Afin d'éviter des redites, nous donnerons le détail des expériences relatives à l'action du sérum spécifique de notre microbe sur ses cultures mobiles et agglutinables dans un prochain chapitre qui aura trait, précisément, aux rapports existant entre la fonction agglutinogène des microbes et leur aptitude agglutinative.

*
* *

VARIABILITÉ DE LA FONCTION AGGLUTINOGENE CHEZ LES DIFFÉRENTES ESPÈCES MICROBIENNES; CHEZ LES ÉCHANTILLONS D'UNE MÊME ESPÈCE; CHEZ UN MÊME MICROBE DANS LES DIVERSES CONDITIONS DE SA VIE. — RAPPORTS DE CES VARIATIONS AVEC LA MOBILITÉ DES MICROBES. — RAPPORTS DE L'APTITUDE AGGLUTINATIVE AVEC LA FONCTION AGGLUTINOGENE.

Nous savons, par ce qui précède, qu'il existe, dans la série des espèces microbiennes comme pour une même espèce, un rapport frappant entre la mobilité d'un microbe et son aptitude agglutinative. Immobiles, certains microbes peuvent être agglutinés par l'action des sérums spécifiques, mais cette action est

1. L'immobilité chez ce microbe ne paraît pouvoir être conservée qu'à la condition d'élever progressivement la température de culture. Au début, le bacille TC se montrait immobile à 25°; nous avons dû pour éviter le retour de la mobilité faire au bout d'un certain nombre de passages les cultures à 28°, 30°, puis 35°. A cette température le microbe est encore immobile; il est probable qu'il y reprendra plus tard sa mobilité. — Nous ne serons donc très probablement parvenu, en fin de compte, qu'à retarder le retour de cette mobilité; mais ce retard a été suffisant pour permettre nos expériences.

toujours peu prononcée ; elle se montre au contraire intense, proportionnelle seulement au degré d'activité du sérum, lorsque la mobilité du microbe est parfaite.

Nous allons retrouver à propos de la fonction agglutinogène des faits semblables. Nous nous rendrons compte, de plus, des relations étroites qui lient l'une à l'autre l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène.

Variabilité de la fonction agglutinogène chez les différentes espèces microbiennes. Ses rapports avec la mobilité des microbes et leur aptitude agglutinative. — Nous pourrions répéter à peu de chose près dans ce chapitre ce que nous avons dit plus haut à propos des variations de l'aptitude agglutinative. — Ce sont les mêmes espèces microbiennes qui se montrent parallèlement mobiles, bien agglutinables et agglutinogènes ou, d'autre part, peu ou pas mobiles, peu ou pas agglutinables, peu ou pas agglutinogènes.

Quelques exemples suffiront à le démontrer. Les microbes les plus aptes à déterminer, dans les humeurs des animaux inoculés, l'apparition d'un pouvoir agglutinant intense sont, d'après les travaux des auteurs (confirmés pour la plupart de ces microbes par nos expériences personnelles), le bacille typhique, les différentes races du *B. coli*, les espèces voisines de ces deux microbes, le bacille de la psittacose, le pyocyanique, les vibrions cholériques et cholériformes, le *b. cyanogène* (ce dernier microbe d'après nos expériences), etc. Tous ces microbes sont doués d'une mobilité extrême ; ils sont, nous l'avons vu, très sensibles à l'action des agglutinines. — La propriété agglutinante ne se montre pas seulement, pour cette catégorie de microbes, dans les humeurs des animaux inoculés expérimentalement ; elle existe aussi, d'une façon presque constante, dans le sang de l'homme ou des animaux infectés spontanément par ces bactéries.

Parmi les microbes doués d'une propriété agglutinogène faible, nous trouvons le bacille de la tuberculose, le bacille de Nicolaïer, le vibron septique, le *B. Chauvæi* ; les microbes de la diphtérie, de la morve, de la peste, etc. L'inoculation des cultures de ces microbes ou des produits de leur activité aux animaux détermine généralement dans leurs humeurs l'apparition de propriétés agglutinantes plus ou moins manifestes, mais dont l'activité n'atteint jamais celles des aggluti-

nines produites par les microbes de la catégorie précédente.

Les humeurs de l'homme ou des animaux, infectés spontanément par ces microbes, ne présentent pas d'une façon constante la réaction agglutinante spécifique; lorsque celle-ci existe, elle est toujours peu intense. Pour ne citer qu'un exemple, le sang des malades atteints de la diphtérie ou du tétanos ne possède aucun pouvoir agglutinant vis-à-vis des bacilles de Nicolaïer et de Loeffler; il faut, pour agglutiner ces microbes, recourir à l'emploi de sérums antitoxiques très actifs.

Les microbes de cette seconde catégorie sont ou bien immobiles, ou bien doués d'une mobilité très faible, souvent temporaire; ils possèdent, nous l'avons vu, une aptitude agglutinative peu développée.

Une troisième catégorie de microbes est celle des microbes inagglutinogènes : bacille de l'influenza, bactéries encapsulées dont le bacille de Friedlander est le type, méningocoque, etc. Ces bactéries sont immobiles et inagglutinables ¹.

Variabilité de la fonction agglutinogène chez un même microbe dans les différentes conditions de sa vie. Rapports de ces variations avec la mobilité du microbe et son aptitude agglutinative ². — L'étude des variations du pouvoir agglutinogène chez une même espèce microbienne dans les différentes conditions de sa vie n'a été jusqu'à présent qu'ébauchée. Les rares travaux où il y est fait allusion ont trait au bacille typhique.

Plusieurs auteurs, M. Rémy en particulier ³, conseillent, lorsqu'on a isolé des eaux un microbe semblable au bacille typhique, mais inagglutinable, de l'inoculer aux animaux et de

1. Rappelons encore une fois que les termes *inagglutinable*, *inagglutinogène* ne doivent pas être pris dans un sens absolu.

Il est possible (et nous le croyons pour notre part) que les microbes dits inagglutinables puissent être agglutinés, à un degré probablement très faible, par un sérum extraordinairement actif, employé à doses considérables par rapport à la quantité de culture mise en expérience.

Nous avons cependant conservé les termes déjà usités de microbes inagglutinables et inagglutinogènes, parce qu'ils sont simples, commodes, et que, pratiquement au moins, ils traduisent un fait exact.

2. Nous avons dit, à propos de l'étude des variations de l'aptitude agglutinative des différentes races d'une même espèce microbienne, qu'il n'était pas prouvé qu'il existât des races chez lesquelles la propriété agglutinative normale dans l'espèce fût définitivement perdue; et qu'il s'agissait plutôt, à notre avis, dans ce cas, d'échantillons ayant perdu temporairement leur agglutinabilité. La même remarque nous paraît s'imposer en ce qui concerne l'existence de races inagglutinogènes d'un microbe normalement agglutinogène.

3. Ces *Annales*, 25 novembre 1900.

rechercher au bout de quelques jours si le sérum de ceux-ci devient actif vis-à-vis d'un échantillon de bacille typhique légitime. Lorsque ce sérum présente un pouvoir agglutinant de 1/40, le microbe doit être considéré comme un bacille typhique véritable. Ces auteurs admettent donc qu'il peut y avoir, jusqu'à un certain point, dissociation entre les propriétés agglutinative et agglutinogène du bacille d'Éberth.

Tel n'est pas l'avis de M. Rehns¹. Cet auteur, ayant isolé d'une rate de typhique un échantillon de bacille d'Éberth peu agglutinable et l'ayant inoculé à des animaux d'expérience, vit que le sérum de ceux-ci se montrait sensiblement moins actif, vis-à-vis d'un bacille typhique légitime, que le sérum d'animaux ayant reçu une dose égale de culture d'un bacille d'Éberth de laboratoire. M. Rehns a fait ses expériences avec des cultures stérilisées par la chaleur.

M. Rodet² a combattu ces conclusions. Pour cet auteur, il n'existerait aucun rapport entre l'aptitude agglutinative d'un microbe et son pouvoir agglutinogène. Les expériences de M. Rodet ont porté sur le bacille typhique et sur le *B. coli*.

Nos expériences personnelles nous ont conduit à une conclusion diamétralement opposée.

Nous avons opéré d'une part avec le bacille typhique, d'autre part avec le bacille TC, isolé par nous d'une cholécystite supprimée d'un cobaye. (Voir plus haut.)

1^o *Expériences pratiquées avec le bacille typhique.* — Les échantillons de bacilles d'Éberth, spontanément inagglutinables et peu mobiles, isolés par nous de la rate d'individus morts de fièvre typhoïde se prêtaient mal aux recherches, puisque, d'une culture à l'autre, ils récupéraient quelquefois leur agglutinabilité et leurs mouvements. Les expériences que nous avons pratiquées avec eux ne nous ont amenés à aucune conclusion; aussi jugeons-nous inutile de les rapporter.

Nous avons fait, par contre, un certain nombre d'expériences intéressantes avec nos cultures de bacille typhique à 42°. A cette température, nous l'avons montré, au bout de quelques passages le bacille d'Éberth devient peu mobile et peu aggluti-

1. *Société de biologie*, 21 décembre 1901.

2. *Société de biologie*, 15 février 1902.

nable. Reporté en bouillon à 36°, il récupère rapidement sa mobilité et son agglutinabilité normales.

Voici quelques-unes de nos expériences¹ :

LAPIN 82. — Ce lapin reçoit dans les veines, le 26 avril, un demi-centimètre cube d'une culture de bacille typhique à 42°. (Cette culture appartient au 2^e passage à 42° du second échantillon dont il a été question dans le chapitre précédent.) La culture inoculée est très peu mobile; un sérum expérimental actif à 1/2000 sur le même échantillon cultivé à 36° n'agglutine la culture, faite à 42°, qu'à 1/5. Le sérum normal de ce lapin est sans action sur le bacille typhique à 36°.

Le 1^{er} mai (6^e jour), le sérum est actif à 1/3 seulement sur le bacille typhique à 36°; le 6 mai (12^e jour), à 1/30; le 13 mai (19^e jour), à 1/1000.

LAPIN 83. — Le pouvoir agglutinant normal du sérum de ce lapin est de 1/1 sur le bacille typhique à 36°. Inoculation le 30 avril, dans les veines, de 1 c. c. d'une culture du même échantillon faite à 42° (5^e passage à cette température); cette culture est très peu mobile, elle est agglutinable à 1/1 seulement par le sérum étalon actif à 1/2000 sur la culture à 36°. Le 6 mai (6^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum du lapin sur le bacille typhique à 36° est de 1/5 au maximum; le 12 mai (12^e jour), il est de 1/40 environ; le 18 mai (18^e jour), de 1/75.

LAPIN 53. — Le pouvoir agglutinant normal du sérum de ce lapin est nul à 1/1 sur le bacille typhique à 36°. Inoculation le 22 mai, dans les veines, de 3/4 de c. c. d'une culture représentant le 12^e passage du même échantillon à 42°. Cette culture est d'une mobilité douteuse; un sérum étalon actif à 1/1000 sur le bacille typhique à 36° ne donne pas avec elle d'amas nets à 1/1. Le 28 mai (6^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum du lapin sur le bacille typhique à 36° est de 1/10 environ; le 3 juin (12^e jour), il est de 1/40; le 9 juin (18^e jour), de 1/20 à peine.

LAPIN 48 (TÉMOIN). — Pouvoir agglutinant normal nul. Ce lapin reçoit dans les veines le 8 janvier, 1/2 c. c. d'une culture du même échantillon (mobile, agglutinable) à 36°. Le 15 janvier (6^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est de 1/25 sur ce microbe et sur un autre échantillon de bacille typhique de laboratoire; le 21 janvier (12^e jour), il est de 1/1000 sur lui-même (un peu plus faible pour l'autre échantillon); le 4 février (18^e jour), de 1/3000 sur les deux échantillons.

Ces expériences montrent que le bacille typhique rendu peu agglutinable et presque immobile par des passages successifs à 42° perd également en grande partie son pouvoir agglutinogène;

1. Toutes nos expériences ont été faites avec ou sur des cultures en bouillon présentant rigoureusement un trouble identique. Nous avons pris pour type, afin d'avoir des résultats comparables, une culture de notre bacille TC de 24 heures à 18°. Cette culture est à peu près moitié moins abondante qu'une culture de bacille typhique ordinaire de 24 heures à 35°. Tous les chiffres cités, en particulier ceux représentant le pouvoir des divers sérums (sérums étalons, sérums des expériences) se rapportent à des cultures présentant un trouble égal.

2° *Expériences pratiquées avec le bacille TC.* — Nous rappelons que ce microbe, isolé par nous d'une suppuration de la vésicule biliaire d'un cobaye inoculé avec une culture de bacille typhique, n'est pas le bacille d'Eberth, mais qu'il appartient à une espèce voisine. Cultivé à 25°-35°, il conserve les caractères qu'il avait au moment de son isolement, il est immobile, inagglutinable. Mis à l'étuve à 18°-20°, il est devenu peu à peu mobile¹ et a recouvré en même temps son aptitude agglutinative.

La virulence de ce microbe est très grande et sensiblement égale, quelle que soit la température à laquelle il s'est développé. Sur une douzaine d'animaux inoculés avec des cultures vivantes de ce microbe, plus de la moitié sont morts; un certain nombre même avant d'avoir pu être utilisés pour nos expériences.

L'inoculation des cultures de ce microbe au lapin détermine, dans les jours qui suivent, une altération très manifeste du sang, lequel devient poisseux et se coagule très rapidement. Ce phénomène a son maximum vers le 6^e jour; il a généralement disparu au 12^e. Nous avons remarqué une altération identique du sang chez les lapins inoculés avec des cultures de bacille typhique, de *B. coli* et du bacille de la psittacose.

Les expériences que nous avons pratiquées avec le bacille TC, dans ses deux formes nous ont montré de la façon la plus nette les relations intimes qui existent entre l'agglutinabilité, la fonction agglutinogène et la mobilité d'un microbe. Ces résultats peuvent être résumés dans les trois propositions qui vont suivre, et que justifient les expériences citées à l'appui de chacune d'elles.

Le bacille TC, dans sa forme immobile et inagglutinable, est inagglutinogène pour lui-même.

Nous avons opéré sur deux échantillons provenant de deux colonies isolées du pus de la vésicule biliaire et ayant tous deux conservé également, en cultures à 25°-35°, leur inagglutinabilité et leur immobilité primitives.

LAPIN 27. — Poids : 1,300 grammes. Le sérum de ce lapin est sans action à 1/1 sur les deux échantillons de TC immobile, comme d'ailleurs sur deux races de bacilles typhiques types. L'animal reçoit le 14 janvier 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC (1^{er} échantillon) sous la peau. Le 17 janvier (6^e jour), son sérum est sans action sur les quatre microbes cités

1. Il nous a été jusqu'à présent impossible de colorer par les méthodes classiques les cils de ce microbe; un échantillon de bacille typhique pris comme témoin dans nos expériences montrait des cils parfaitement colorés.

plus haut; le 23 janvier (12^e jour), même résultat; le 7 février (18^e jour), même résultat.

LAPIN 97. — Poids : 2,480 grammes. Son sérum est sans action, à 1/1, sur les deux échantillons de TC immobile et sur deux races de bacille typhique type. Cet animal reçoit le 17 janvier 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (2^e échantillon) sous la peau. Le 23 janvier (6^e jour), son sérum est sans action sur les deux cultures de bacille typhique et sur les échantillons de TC immobile; le 30 janvier (12^e jour), même résultat pour les deux TC immobiles, très légers amas à 1/1 avec les deux échantillons de bacille typhique; le 13 février (18^e jour), résultat identique au précédent.

Le sérum des animaux inoculés parallèlement avec deux cultures différentes de bacilles typhiques légitimes s'est montré sans action sur les deux échantillons de TC immobile, ainsi que le montrent les expériences suivantes :

LAPIN 25. — Reçoit la même dose d'une culture de bacille typhique légitime. Au 6^e jour, le sérum agit à 1/30 sur les deux échantillons de bacille typhique; le 12^e jour à 1/200; le 18^e jour à 1/3000. Aucune action les 6^e, 12^e et 18^e jours sur les deux échantillons de TC immobile.

LAPIN 18. — Inoculé avec 1 c. c. de culture de bacille d'Éberth. (Voir plus haut son action sur le bacille typhique). Aux 6^e, 12^e et 18^e jours, il est inactif pour les deux échantillons de TC immobile.

Le bacille TC, dans sa forme mobile (et agglutinable), est agglutinogène pour lui-même, mais non pour sa forme immobile.

Nous rappelons encore une fois que par des passages successifs à 18°-20°, la culture de TC primitivement immobile (et le restant à 25°-35°), a acquis peu à peu une mobilité très nette. En même temps que cette mobilité, l'aptitude agglutinable et la fonction agglutinogène se sont développées.

Expériences faites avec cette forme mobile de TC :

LAPIN 90. — Poids : 4,560 grammes. Le sérum de ce lapin agglutine très légèrement à 1/1 l'échantillon TC dans sa forme mobile; il est sans action sur un bacille typhique de laboratoire. Ce lapin reçoit sous la peau, le 7 mai, 1 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC mobile. Le 14 mai (7^e jour), son sérum est actif à 1/100 sur TC mobile, à 1/1 sur 2 échantillons de TC immobile, à 1/20 sur un échantillon de bacille typhique légitime¹. Le 20 mai (13^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est de

1. L'apparition dans le sérum d'un animal inoculé avec une culture microbienne d'un pouvoir agglutinant manifeste vis-à-vis d'un microbe d'une espèce étrangère et mobile (le bacille typhique dans le cas particulier) est un fait intéressant et qui mérite d'être signalé. Sans être constant, il n'est pas exceptionnel; plusieurs de nos expériences le montrent. Ce pouvoir agglutinant apparaît généralement vers le 4^e ou 6^e jour après l'inoculation; il a son maximum vers le 10^e jour, il baisse

1/800 pour TC mobile, de 1/1 pour un échantillon de TC immobile (échantillon correspondant) et de 0 pour l'autre; deux cultures différentes de bacille typhique sont agglutinées à 1/20. Le 29 mai (21^e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/1500 pour TC mobile, de 1/1 et de 0 pour les deux échantillons de TC immobile; il est de 1/40 à 1/20 pour les deux cultures de bacille typhique, de 1/1 pour le bacille de la psittacose (mobile), de 1/5 pour un bacille éberthiforme de H. Durham (mobile), de 1/5 pour un échantillon de *B. coli*.

LAPIN 98. — Poids : 1,330 grammes. Le sérum de ce lapin agglutine incomplètement à 1/1 un échantillon de bacille typhique légitime; il donne des amas à 1/10 avec TC mobile. Ce lapin reçoit sous la peau, le 17 mai, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC mobile. Le 23 mai (6^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est de 1/1 pour le bacille typhique, de 1/10 pour TC mobile. Le 29 mai (12^e jour), le sérum agglutine TC mobile à 1/300; il agglutine incomplètement à 1/1 les deux échantillons de TC immobile; le bacille typhique est agglutiné à 1/5. Le 4 juin (18^e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/300 pour TC mobile, de 1/1 à 1/5 pour deux échantillons de bacille typhique; de 1/1 à peine pour un échantillon de *B. coli*, de 1/5 pour le bacille éberthiforme de H. Durham, de 1/1 pour le bacille de la psittacose.

Le bacille TC, dans sa forme immobile et inagglutinable, est inagglutinogène non seulement pour lui-même, mais encore pour sa forme mobile et agglutinable.

Les expériences suivantes le démontrent :

LAPIN 71. — Poids : 1,365 grammes. Le sérum de ce lapin est inactif à 1/1 sur TC dans ses deux formes mobile et immobile; il donne à ce taux de très petits amas avec une culture d'un bacille typhique type. Ce lapin reçoit sous la peau, le 6 juin, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (36^e passage à 25°-35°). Le 12 juin (6^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est nul à 1/1 pour TC mobile et immobile et pour le bacille typhique. Le 18 juin (12^e jour), le sérum agglutine le bacille typhique à 1/1, il est sans action sur TC immobile et donne de très petits amas à 1/1 avec TC mobile. Le 24 juin (18^e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/1 pour le bacille typhique et TC mobile, il est nul pour TC immobile.

LAPIN 87. — Poids : 830 grammes. Le sérum de ce lapin est inactif à 1/1 sur les deux formes mobile et immobile de TC et sur le bacille typhique. Ce lapin reçoit sous la peau, le 7 juin, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (57^e passage à 25°-35°). Le 13 juin (6^e jour), le

ensuite pour disparaître au bout de 20 à 30 jours. Le pouvoir agglutinant n'est jamais bien élevé; il a atteint cependant dans un cas 1/40. (Voir lapin 87.)

Il n'est donc pas possible de considérer comme bacille typhique légitime, ainsi que le fait Remy, un microbe inagglutinable dont l'inoculation aux animaux d'expérience détermine dans leurs humeurs l'apparition d'un léger pouvoir agglutinant vis-à-vis du bacille typhique.

pouvoir agglutinant du sérum est nul à 1/1 pour TC mobile et immobile, il est de 1/40 environ pour le bacille typhique¹. Le 19 juin (12^e jour), le sérum agglutine le bacille typhique à 1/20, il est sans action à 1/1 pour TC immobile, il agit d'une façon très incomplète au même taux sur TC mobile. Le 25 juin (18^e jour), le pouvoir agglutinant est de 1/10 pour le bacille typhique, il est nul pour TC immobile et de 1/5 au plus pour TC mobile.

LAPIN 55. — Poids : 1,420 grammes. Le sérum de ce lapin est inactif à 1/1 pour le bacille typhique et pour TC immobile, il donne des amas très petits à 1/1 avec TC mobile. Ce lapin reçoit sous la peau, le 8 juin, 1/3 de c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de TC immobile (58^e passage à 25°-30°). Le 14 juin (6^e jour), le pouvoir agglutinant du sérum est nul à 1/1 pour TC mobile et immobile et pour le bacille typhique; le 20 juin (12^e jour), même résultat pour TC immobile et pour le bacille typhique; TC mobile est agglutiné à 1/1. Le 26 juin (18^e jour), le sérum est inactif à 1/1 pour les trois microbes.

Ces expériences portent en elles-mêmes leurs conclusions.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET DÉDUCTIONS PRATIQUES

Il résulte des faits que nous venons d'exposer que l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène, propriétés probablement inhérentes à toutes les cellules libres, en particulier aux microbes, offrent les variations les plus grandes, soit qu'on les considère dans la série des êtres unicellulaires, soit qu'on les étudie chez certaines espèces microbiennes, dans des conditions différentes de leur vie.

Ces variations sont telles qu'on serait en droit de diviser pratiquement les microbes en espèces ou races agglutinables et inagglutinables et en espèces ou races agglutinogènes et inagglutinogènes. En ce qui concerne spécialement le bacille typhique, le plus intéressant et le mieux étudié de ces microbes au point de vue expérimental, la division de ses échantillons divers en agglutinables et inagglutinables s'est déjà complètement imposée aux auteurs.

Agglutinabilité et pouvoir agglutinogène sont des propriétés parallèles, indissociables chez un même microbe; nos expériences le montrent de la façon la plus nette. Aussi croyons-nous que l'on peut avancer que tout microbe agglutinable est en même temps agglutinogène et que tout microbe inagglutinable est inagglutinogène.

1. Voir la note précédente.

Bien que la mobilité ne soit pas une condition absolue de l'existence des propriétés agglutinative et agglutinogène chez les microbes, il semble démontré qu'elle joue un rôle indéniable, au point de vue de l'importance de ces fonctions. Seuls les microbes mobiles sont doués d'une sensibilité véritable à l'action des agglutinines, seuls ils sont nettement agglutinogènes; les microbes dépourvus de mobilité sont peu ou pas agglutinables, peu ou pas agglutinogènes. La mobilité des microbes tenant à la présence de cils à leur surface, il paraît légitime de penser que c'est la tunique ciliée de ces êtres qui joue le rôle capital dans le phénomène de l'agglutination¹. Les microbes mobiles doivent l'importance de leurs propriétés agglutinative et agglutinogène au développement de cette tunique ciliée. Les microbes immobiles, chez lesquels cette tunique est rudimentaire et se réduit sans doute à un simple revêtement, ne possèdent ces propriétés qu'à un degré infiniment plus faible. Aucun microbe cependant ne doit en être absolument dépourvu, car tous possèdent une membrane d'enveloppe.

La conclusion générale à tirer de nos expériences comme des travaux antérieurs nous paraît être la suivante : l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène sont des propriétés de la membrane d'enveloppe des microbes; elles sont d'autant plus marquées chez ces êtres que cette membrane est plus importante². Une même conclusion nous paraît devoir s'appliquer aux cellules libres de l'organisme.

Au point de vue pratique, nos expériences n'auront peut-être pas été sans utilité. L'existence de races ou échantillons de bacilles typhiques inagglutinables et inagglutinogènes rend actuellement très délicat le problème de l'analyse des eaux. La difficulté qu'on éprouve à distinguer ces races anormales du bacille d'Eberth de bactéries analogues, mais banales, est souvent extrême. Si les conclusions auxquelles tendent nos expériences se trouvent confirmées, le diagnostic de ces diverses espèces se trouvera simplifié. Tout microbe agglutinable étant

1. Nous pouvons citer à l'appui de cette hypothèse les expériences de M. Malvoz montrant que les bacilles typhiques lavés, c'est-à-dire privés en grande partie de leurs cils, sont infiniment peu sensibles à l'action du sérum spécifique. Ces expériences ont été confirmées par les recherches personnelles d'un de nous (ces *Annales*, loc. cit.) et par celles d'Harrison (*Centralblatt f. Bakt.* 31 août 1901.)

2. Ou plutôt que cette membrane contient en plus grande abondance la substance agglutinable et agglutinogène spécifique.

doué de mobilité, il deviendra inutile de tenir compte dans une analyse d'eau des microbes voisins du bacille d'Eberth inagglutinables par le sérum typhique et mobiles. N'ayant plus à se préoccuper que des bactéries immobiles et inagglutinables, l'expérimentateur devra chercher à leur restituer leurs propriétés disparues. Des cultures successives à une température relativement basse rendront plus facile sans doute le retour de la mobilité originelle. Lorsque la mobilité sera revenue, l'aptitude agglutinative et la fonction agglutinogène seront en même temps récupérées et il deviendra facile de reconnaître si le microbe étudié est ou non un bacille typhique légitime.

Une solution complète pourrait donc être obtenue, sauf dans le cas où il s'agirait de microbes ayant perdu définitivement leur mobilité et avec elle l'agglutinabilité et la fonction agglutinogène. Mais nous avons déjà vu qu'il n'était nullement prouvé qu'il existait de ces races, et qu'au contraire dans tous les cas où les échantillons de bacille typhique inagglutinables au moment de leur isolement avaient pu être suivis pendant assez longtemps, le retour de l'agglutinabilité s'était opéré d'une façon constante.

Il serait sans doute téméraire d'ériger dès à présent en loi les quelques réflexions que nous venons de formuler et d'en faire la base de la marche à suivre dans une analyse d'eau pour le diagnostic des formes anormales du bacille typhique. L'avenir montrera quelle est au point de vue pratique la portée exacte de nos expériences.

ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA TOXICITÉ DE L'ÉOSINE

ET DE QUELQUES AUTRES SUBSTANCES

POUR LES PARAMÉCIES

PAR LE D^r LEDOUX-LEBARD.

(Travail du laboratoire de M. le D^r Roux.)

Raab¹ a étudié l'action, sur les paramécies, d'un certain nombre de substances dont les solutions aqueuses sont fluorescentes : l'acridine, la méthylphosphine, la quinine, l'éosine. Il a observé que, dans ces solutions, les paramécies meurent plus rapidement à la lumière qu'à l'obscurité. Cet effet de la lumière ne serait pas dû à toutes les radiations, mais seulement à celles qui produisent la fluorescence, soit surtout aux rayons violets pour l'acridine, aux rayons verts pour l'éosine. Aucun développement de substance toxique n'a pu être constaté dans les solutions éclairées. Raab, considérant que la fluorescence est la propriété commune à ces solutions d'acridine, de phosphine, d'éosine, de quinine, dont le pouvoir toxique augmente à la lumière, attribue ce résultat à la fluorescence. Celle-ci est le signe d'une transformation d'énergie qui serait funeste aux paramécies et causerait leur mort². La conclusion est singulière et

1. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien, *Zeitsch. f. Biolog.*, Bd. XXXIX 1900.

2. Raab écrit : « Es ist wahrscheinlich dass fluorescirende Körper die Energie des Lichtstrahlen in lebendesehemische Energie umzusetzen vermögen. »

Tappeiner dans un article de la *Munch med. Woch* (n° 44, 1901) mentionne le travail de Raab et rappelle l'explication donnée par cet auteur : Les substances considérées deviendraient plus toxiques, par la production de la fluorescence, à cause d'une augmentation de leur énergie chimique.

Dans le même article de Tappeiner, on trouvera l'analyse de deux travaux que nous regrettons d'avoir connus trop tardivement pour les citer dans le texte de notre mémoire : celui de Danielsohn qui a étudié l'action sur les infusoires, de différents dérivés de l'acridine et celui de Jacobson qui a observé l'action combinée de l'éosine et de la lumière sur les cellules épithéliales du pharynx de la grenouille et attribue à la fluorescence une action possible sur les phénomènes d'escamose. Il a injecté à des grenouilles 0,02 gram. d'éosine dans l'eau physiologique, en les maintenant à l'obscurité, après cette injection. Au bout de 48 heures, l'épithélium à cils vibratiles était coloré en rouge. Exposés à la lumière dans l'eau physiologique, les cellules perdaient la mobilité de leurs cils, en quelques heures ; à l'obscurité, les cils restaient mobiles pendant plus d'un jour.

l'auteur, après ses intéressantes expériences, nous ramène au point de départ, car il s'agit de savoir comment cette transformation d'énergie produit la mort des paramécies. C'est ce que nous voudrions éclaircir dans ce mémoire.

La technique est semblable à celle que nous avons indiquée dans notre précédent mémoire¹. On verse la solution à étudier dans un verre de montre et celui-ci est placé dans une boîte de Petri renversée, couvercle en bas, contenant un peu d'eau et servant de chambre humide. Un support plat, lame métallique, pièce de monnaie, sert à maintenir le verre de montre à hauteur suffisante au-dessus de la couche d'eau inférieure. Nous versons 2 c. c. de solution dans le verre de montre, en y ajoutant, suivant la richesse de la culture, un ou plusieurs dixièmes de centimètre cube de culture. Les boîtes de Petri contenant ces dilutions sont, les unes, soumises à l'action de la lumière, les autres, servant de témoins, mises à l'obscurité.

La toxicité des solutions est évaluée d'après le temps nécessaire pour tuer une quantité déterminée de culture. Ou bien, on compte les paramécies tuées, en faisant, s'il est nécessaire, des additions successives de 1/10 c. c. de culture, jusqu'à ce que les paramécies ne meurent plus, dans l'intervalle de 24 heures, à l'obscurité. Les nombres obtenus mesurent le pouvoir toxique des liquides à comparer.

Les paramécies appartiennent à l'espèce *P. Caudatum* et sont cultivées par le procédé Balbiani².

L'éosine utilisée était l'éosine W. G. de Grüber. Une solution mère à 0,50 pour 100, maintenue à l'obscurité, servait à préparer des solutions à titre connu, et particulièrement la solution à 1 : 1000, dont l'action sur les paramécies n'est ni trop lente ni trop rapide et peut être facilement suivie.

On prépare dans un verre de montre 2 c. c. de solution d'éosine à 1 : 1000 additionnée de 1/10 c. c. de culture; le verre de montre est placé dans une boîte de Pétri qu'on expose à la lumière. Une dilution de paramécies identique à la précédente est mise à l'obscurité.

1. Ces *Annales*, juillet 1902.

2. *Arch. d'anat. micr.*, 1898, p. 518.

Les paramécies ne tardent pas à mourir dans l'éosine éclairée; elles nagent d'abord moins rapidement, puis elles abandonnent les couches supérieures du liquide, se tiennent au fond en progressant lentement. Souvent, elles présentent des mouvements de rotation autour de l'axe transversal du corps, ou bien l'axe longitudinal, par un mouvement continu dans le même sens, décrit une surface conique, ayant pour sommet l'une des extrémités. Les vésicules contractiles se paralysent, offrent une dilatation excessive, souvent limitée à l'une d'entre elles. La mort est suivie de la coloration du noyau, puis le protoplasme se colore, à son tour. Des altérations modifiant le pouvoir osmotique du sarcode ou la perméabilité de la membrane d'enveloppe, causent parfois une déformation de l'infusoire, ou bien il se produit des boules transparentes d'exsudation superficielle. Il est assez fréquent de constater une agglutination des paramécies en agglomérations irrégulières.

Dans la solution maintenue à l'obscurité, les paramécies continuent à vivre et à nager, pendant un temps très variable. On en retrouve quelquefois de vivantes après deux ou trois semaines; elles ont diminué de volume et nagent avec lenteur.

Le pouvoir microbicide de l'éosine éclairée augmente avec l'intensité de la lumière. Les paramécies mises dans l'éosine meurent en quelques minutes au soleil, en un temps plus long à l'ombre, et qui augmente, à mesure que la lumière diminue.

Les expériences qui précèdent confirment simplement celles de Raab.

Pour le même éclairage, l'action microbicide est d'autant moins rapide que le nombre des paramécies est plus élevé.

On peut s'assurer facilement, ainsi que l'a fait Raab, que la mort des paramécies, dans l'éosine éclairée, est due aux radiations absorbées et que les autres sont inactives. Il suffit de placer le mélange d'éosine et de paramécies dans un tube qu'on fixe suivant l'axe d'un bocal contenant la même solution d'éosine, et de manière que la surface libre du liquide dans le tube soit inférieure à celle de la solution qui l'entoure. Lorsque celle-ci est en couche suffisamment épaisse, les radiations provoquant la fluorescence de l'éosine n'arrivent plus au tube central; les paramécies continuent à vivre, bien qu'exposées à la lumière.

Contrairement aux conclusions de Raab, nous allons voir que les radiations actives altèrent la composition de l'éosine et y développent une substance toxique pour les paramécies.

On expose au midi, le 26 novembre, à 11 h. 11, par un temps nuageux, un verre de montre contenant 2 c. c. d'éosine à 1 : 1000, en chambre humide. Un autre verre de montre contenant une solution semblable est mis à l'obscurité. Après une heure d'éclairement, on ajoute 1/10 c. c. de paramécies à la première solution et on la met à l'obscurité. On ajoute aussi la même quantité de culture à la seconde solution qu'on laisse à l'obscurité. Cette quantité de culture représente une soixantaine de paramécies.

Au bout de trois quarts d'heure, les paramécies ne nagent plus qu'avec lenteur dans l'éosine éclairée, elles tombent au fond, bientôt elles sont toutes immobilisées et, en moins de 3 heures, la plupart commencent à se colorer. Dans l'éosine non éclairée, toutes les paramécies continuent à nager.

La lumière altère donc la composition de l'éosine. On sait bien que c'est une couleur fugace, peu résistante à la lumière, comme le démontre la décoloration assez rapide, au soleil, des solutions faibles d'éosine. L'expérience qui précède nous apprend qu'il se produit alors une substance toxique qu'il appartient au chimiste de déterminer. Nous voulons montrer seulement qu'à l'aide des paramécies il est possible d'analyser d'un peu plus près quelques-unes des conditions de l'expérience.

L'intensité de la lumière est un facteur important. On expose des solutions d'éosine à 1 : 1000, les unes à une forte lumière, les autres à une lumière faible; les solutions sont éclairées, par exemple, à des heures différentes du jour. On constate que les paramécies ajoutées, après l'éclairement, meurent d'autant plus vite que la lumière était plus intense.

L'influence de la durée de l'éclairement est moins facile à déterminer avec une lumière variable comme celle du soleil. Si une solution est éclairée plus longtemps qu'une autre et qu'à la fin de l'éclairement l'intensité de la lumière augmente, on pourra attribuer à cette circonstance les résultats observés, aussi bien qu'à la durée plus grande de l'éclairement. Nous avons cherché à éviter cet écueil, dans notre expérience.

Quatre solutions d'éosine à 1 : 1000 : n° 1, n° 2, n° 3, n° 4, ont été exposées à la lumière à la fenêtre du laboratoire, côté sud, le 27 novembre.

N° 1, pendant 1/2 heure, de 11 h. 25 à 11 h. 55.

N° 2, pendant 1 heure, de 11 h. 25 à 12 h. 25.

N° 3, pendant 1 h. 1/2, de 11 h. 11 à 12 h. 41.

N° 4, pendant 2 heures, de 11 h. 11 à 1 h. 11.

Après l'éclairement, les solutions ont été additionnées chacune de 1/10 c. c. de culture et mises à l'obscurité. Les paramécies sont mortes dans n° 1, n° 2, n° 3, n° 4 après des intervalles de temps représentés respectivement par 1 h. 44, 1 h. 37, 1 h. 35, 1 h. 19. Ces temps sont d'autant moins longs que l'éclairement a duré davantage.

Toutefois, la toxicité ne paraît pas augmenter indéfiniment avec la durée de l'éclairement. Des solutions d'éosine à 1 : 1000 ont été exposées à la fenêtre nord du laboratoire pendant le premier jour, puis à des lumières plus faibles pendant les jours suivants. La toxicité des solutions éclairées pendant 6 jours de suite n'était pas supérieure à celle des solutions éclairées pendant le premier ou les deux premiers jours.

D'autres expériences vont nous conduire à l'explication de ces faits : elles ont pour but de montrer en quoi se distingue l'action de l'éosine éclairée, suivant que les paramécies sont ajoutées au début ou à la fin de l'éclairement.

On prépare des dilutions à 1 : 4, à 1 : 2, à 3 : 4, d'une culture de paramécies, et des verres de montre marqués a, b, a', b', a'', b'', a''', b''', contenant chacun 2 c. c. de solution d'éosine à 1 : 1000.

On ajoute, à la solution a, 4/10 c. c. de la dilution de culture à 1 : 4 ; à la solution a', 4 1/0 c. c. de la dilution à 1 : 2 ; à la solution a'', 4/10 c. c. de la dilution à 3 : 4 ; à la solution a''', 4/10 c. c. de la culture elle-même.

On expose alors les solutions a, a', a'', a''' à la lumière, ainsi que les solutions b, b', b'', b''' auxquelles on a rien ajouté.

On suit avec attention le sort des paramécies. Elles sont mortes au bout de 1 h. 6, dans a. A ce moment, on ajoute aussi à b, 4/10 c. c. de la dilution à 1 : 4 et l'on met b à l'obscurité. Or, il faut 1 h. 55 pour que toutes les paramécies soient mortes dans b.

On répète les mêmes opérations avec a', b'. Les paramécies

sont mortes dans *a'* au bout de 1 h. 16. On ajoute alors à *b'* 4/10 de la dilution à 1 : 2 et on met *b'* à l'obscurité. Au bout de 4 heures, il y a encore des paramécies vivantes dans *b'*.

Dans *a''* les paramécies sont tuées en 1 h. 23, mais dans *b*, additionnée, après l'éclairement, de 4/10 c. c. de dilution à 3 : 4, la plupart des paramécies vivent encore le lendemain bien que ralenties dans leurs mouvements.

Dans *a'''* les paramécies sont tuées au bout de 2 h. 9, tandis que dans *b'''* elles survivent presque toutes, après 24 heures.

Les solutions *a* se sont donc montrées plus actives que les solutions *b*. La quantité de substance toxique qui se produit dans l'éosine éclairée est inférieure à celle qui se produit, pendant le même temps, dans une solution semblable contenant des paramécies.

On voit aussi que dans les solutions *b* additionnées de culture, puis éclairées, le temps nécessaire pour tuer les paramécies augmente avec leur nombre, ainsi que nous l'avons dit précédemment.

Il en est de même dans les solutions *b*, additionnées de culture, après l'éclairement. Le temps nécessaire pour tuer les paramécies s'accroît aussi avec le nombre des paramécies, mais ici cet accroissement est très rapide, si bien que les paramécies, lorsqu'elles sont assez nombreuses, finissent par résister.

Ces faits s'expliquent aisément si, dans les mêmes conditions d'intensité lumineuse, de température, la quantité de substance toxique produite sous l'influence de la lumière ne dépasse pas un certain degré de concentration. Les paramécies sont-elles dans l'éosine pendant l'éclairement, elles absorbent la substance toxique qui se reforme aussitôt par l'action de la lumière, est de nouveau absorbée, et ainsi de suite jusqu'à la mort de toutes les paramécies. Celles-ci, au contraire, sont-elles ajoutées à l'éosine préalablement éclairée puis mise à l'obscurité, si leur nombre est assez grand, le pouvoir toxique du liquide s'abaisse au-dessous du degré qui cause la mort, grâce à une absorption de chaque infusoire, la substance nuisible n'est pas renouvelée par l'action de la lumière, la toxicité diminue et permet la survie des organismes.

On comprend ainsi comment l'altération de l'éosine et l'accroissement de toxicité, dus à l'action de la lumière, peuvent

échapper facilement à l'observation, soit qu'on ajoute à la solution préalablement éclairée un nombre très grand de paramécies, soit que, pour un nombre déterminé de ces infusoires, on emploie une quantité trop faible de solution.

L'éosine éclairée, mise à l'obscurité, à la température ordinaire, perd, au bout de 8 à 15 jours, cet accroissement du pouvoir toxique dû à l'éclairement.

L'éosine obtenue par évaporation à 37° ou à la température ordinaire d'une solution éclairée, puis redissoute dans la même quantité d'eau perd sa toxicité surélevée et se comporte comme l'éosine non éclairée.

Le contact de la solution avec l'air pur une large surface favorise l'apparition du pouvoir toxique. Celui-ci est faible lorsque la solution est contenue dans un tube fermé, effilé et rempli de liquide jusque dans l'effilure. Le vide incomplet obtenu à l'aide de la trompe diminue également la production de substance toxique, sous l'influence de la lumière.

La possibilité d'une oxydation de l'éosine éclairée en présence de l'air nous avait conduit à supposer qu'en ajoutant à l'éosine faible (à 1 : 5000) des plantes vertes, le dégagement d'oxygène, à la lumière, favoriserait l'apparition du pouvoir toxique. C'est le contraire qui s'est produit. Une touffe de spirogyres ajoutée à l'éosine à 1 : 5000, avant l'éclairement, supprime le pouvoir toxique : les paramécies ajoutées à la solution après l'éclairement ne meurent pas, comme dans la solution témoin.

L'absorption d'acide carbonique et le dégagement d'oxygène dus à la fonction chlorophyllienne ne paraissent pas intervenir dans ce cas; on obtient en effet le même résultat lorsqu'on ajoute les spirogyres après l'éclairement. Nous croyons qu'il s'agit plutôt de phénomènes d'absorption, car les mêmes faits se produisent avec la craie et la poudre de lycopode.

D'autres substances se comportent comme l'éosine, sous l'influence de la lumière; ce sont : l'acridine, la fluorescéine, les sels de quinine. Les solutions de ces corps sont plus toxiques, pour les paramécies, à la lumière qu'à l'obscurité. L'accroissement de toxicité se manifeste également pour les paramécies ajoutées après l'éclairement. On le démontre comme pour l'éosine. Ces

corps s'altèrent à la lumière et donnent naissance à des composés plus toxiques.

Raab, dans ses expériences, s'est servi d'une solution d'acridine à 1 : 20,000, après addition d'acide chlorydrique. C'est aussi une solution à ce titre qui nous a servi dans nos recherches. La fluorescéine à 1 : 4000 s'est montrée sensiblement moins toxique, après éclaircissement, que l'éosine W. G. au même titre.

Le sulfate de quinine est extrêmement toxique pour les infusoires. D'après Grothe¹, la solution à 1 : 4000 les tue en 2 minutes, la solution à 1 : 40,000 les tue en 2 heures avec signes de paralysie au bout de 5 minutes. Aussi est-il nécessaire, pour mettre en évidence l'action de la lumière de prendre une solution très faible, par exemple à 1 : 50,000. Les résultats observés ont été moins constants qu'avec l'acridine, la fluorescéine et l'éosine.

Les solutions de ces corps sont fluorescentes ; les radiations absorbées se transforment ; si, dans cette transformation, une partie de l'énergie est utilisée pour une action chimique, les produits formés peuvent augmenter la toxicité de la solution primitive. Telle est, croyons-nous, la relation entre la fluorescence et l'apparition ou l'accroissement du pouvoir toxique, sous l'influence de la lumière.

L'organisme des paramécies est un réactif biologique qui permet, à l'aide d'un procédé très simple, de reconnaître soit la production, soit la variation quantitative d'une substance toxique pour les infusoires.

1. *Deutsch. Arch. f. Kl. Med.*, Bd. LVI, 1896.

RECHERCHES
SUR
LE RÔLE DE L'ENVELOPPE DES MICROBES
DANS L'AGGLUTINATION

PAR W. DEFALLE

Le point de départ de ces recherches est une observation rapportée par M. Malvoz dans son travail sur l'agglutination du *bacillus typhosus* (1). Ayant filtré et lavé à grande eau sur bougie Chamberland des bacilles d'Eberth-Gaffky qu'il voulait débarrasser des produits de culture dont ils étaient imprégnés, il trouva que les microbes obtenus en raclant la bougie ne s'agglutinaient plus par les substances chimiques actives, formaline, safranine, etc., pas plus que par le typhus-sérum. En même temps, ces bacilles lavés n'étaient plus mobiles et on ne parvenait plus à déceler des cils chez ces microbes. M. Malvoz émit l'hypothèse que peut être les cils jouaient un rôle dans l'agglutination.

Dineur (2) reprit cette recherche, et dans un travail intéressant montra l'importance de l'enveloppe ciliaire dans le phénomène de l'agglutination. Il alla beaucoup plus loin que M. Malvoz en concluant que le mécanisme de la réaction agglutinante subie par le bacille typhique sous l'influence du typhus-sérum ou des agglutinants chimiques de M. Malvoz « est intimement lié à la présence de l'enveloppe ciliée et résulte apparemment des modifications qui atteignent cette dernière. Sous leur influence, les flagella acquièrent la propriété d'adhérer les uns aux autres en s'entremêlant peu à peu et emprisonnant ainsi dans leur réseau les bacilles auxquels ils sont fixés et qu'ils ont entraînés à leur suite ».

Cette interprétation, proposée en 1898, ne serait plus soutenable aujourd'hui, sous cette forme tout au moins, et Dineur lui-

même doit y avoir renoncé depuis que l'on a découvert que des éléments incontestablement dépourvu de cils, tels que les hématies (Bordet, Nolf), les levures (Malvoz) subissent parfaitement l'agglutination par les sérums spécifiques.

Mais l'observation de M. Malvoz que les cils jouent un rôle dans le phénomène de l'agglutination des microbes reste parfaitement soutenable : l'expérience précitée reste un fait contrôlé et amplifié par Dineur et elle ne peut guère être interprétée autrement que ne l'avait fait le professeur de Liège.

D'ailleurs, s'il est parfaitement vrai que des éléments non ciliés (globules du sang, microbes dépourvus de flagella) confèrent au sérum, après leur résorption dans l'organisme, un certain pouvoir agglutinant, les titres d'agglutination sont généralement bien plus élevés avec les bacilles richement ciliés. Jamais, à notre connaissance, on n'a obtenu, même après des injections longtemps continuées soit d'hématies, soit de microbes sans cils tels que le streptocoque, le bacille de la tuberculose, le bacille diphtérique, des titres agglutinatifs comparables à ceux du typhus-sérum obtenu chez certains animaux et qui sont de 1/100,000 et même davantage, c'est-à-dire qu'un litre de ce sérum est capable de *floculer* 100,000 litres d'émulsion de bacille typhique. Courmont (3) cite un titre agglutinant de sérum antitétanique de 1/50,000.

Or, les bacilles typhique et tétanique ont une belle enveloppe de cils longs et flexueux. Le sérum antistreptococcique par contre, bien qu'obtenu à la suite d'injections de streptocoques, agglutine à peine ces derniers : ce microbe est complètement dépourvu d'enveloppe.

Il a paru à M. Malvoz que son hypothèse renfermait encore, à l'heure actuelle, une certaine part de vérité et il nous a engagé à étudier systématiquement, d'une façon plus étendue qu'on ne l'a fait jusqu'ici, le rôle de l'enveloppe des microbes aussi bien dans le phénomène de l'agglutination que dans la production elle-même des anticorps.

Notre travail a consisté d'abord à réunir une collection de microbes se prêtant particulièrement bien à l'étude de ces phénomènes. Nous avons choisi des bacilles possédant de nombreux cils et d'autres bacilles de même taille approximative, mais peu ou point ciliés. Il fallait se demander aussi quelle influence

pouvait avoir l'enveloppe des microbes, quand celle-ci est constituée non pas par des flagella, mais soit par une couche muqueuse plus ou moins développée qui existe chez certains organismes, soit par une capsule nettement différenciée. Ce qui fait surtout la difficulté d'un bon choix de microbes pour ce genre de recherches, c'est qu'il faut trouver des microorganismes dont on puisse, sans trop de difficultés, obtenir des émulsions riches en microbes isolés et agglutinables; or beaucoup de bacilles et de cocci ne sont pas dissociables dans les liquides physiologiques.

Voici les microbes qui ont servi à nos essais :

1° *Bacillus typhosus* : (a) échantillon dit *Gaffky*, provenant du laboratoire de Gaffky, et cultivé depuis longtemps à l'Institut de Liège. Bacille très mobile, avec 12-15 cils longs et flexueux (méthode Van Ermengem); (b) échantillon isolé par M. Malvoz : *typhosus V* de sa collection, un peu moins mobile que Gaffky; (c) *typhosus* isolé par M. Beco de la rate d'un typhique, très mobile;

2° *Bactérium coli*. Microbe isolé par M. Malvoz des selles de nourrisson, cultivé artificiellement depuis plusieurs années : bacilles peu mobiles, les uns sans cils, les autres avec 1-2-3-4 cils, mais moins longs que ceux du *typhosus*;

3° *Bacille V*, de la collection de M. Malvoz, longs bacilles pourvus de magnifiques cils (12 à 15), très mobiles;

4° *Bacillus mesentericus*, de la collection idem, beaux bacilles avec cils nombreux comme le précédent et très mobiles;

5° *Bacillus mycoïdes*, id., id., id.;

6° *Vaccin I* du charbon, de l'Institut Pasteur : bacilles non ciliés, quoique très légèrement mobiles;

7° *Bacillus capsulatus*, isolé par M. Herla et conservé depuis longtemps au laboratoire de Liège. Ce microbe, voisin du pneumo-bacille de Friedländer, présente une capsule muqueuse excessivement épaisse, dont le contour externe est irrégulier, mal délimité; le microbe est enfoui dans cette gangue muqueuse comme un noyau de fruit (la méthode Van Ermengem teinte cette capsule en gris).

8° *Bacillus mucosus*, du laboratoire de Kraal : bacille très court avec capsule muqueuse énorme, visible même sans coloration du microbe;

9° *Bacillus capsulatus* de Pfeiffer, du laboratoire de Kraal, bacille court avec mince capsule muqueuse ;

10° *Bacillus capsulatus septicus*, microbe comme le précédent, mais un peu plus long ;

11° *Pneumobacille* de Friedlander : culture entretenue depuis longtemps à Liège ; ce microbe, qui présente habituellement une capsule dans les cultures fraîches, a perdu celle-ci après un long séjour au laboratoire. Il a pris les dimensions du *B. coli*, immobile, non capsulé ;

12° *Mycobacterium Phlei*, bacille de la phléole, provenant de l'Institut Pasteur de Lille : c'est un bacille morphologiquement semblable au bacille de la tuberculose, immobile, dépourvu de cils, isolé par Moëller de certaines graminées ;

13° *Micrococcus agilis ruber*, du laboratoire de Kral, microcoque mobile, avec cils ;

14° *Microcoque*, microbe banal recueilli dans les eaux, immobile sans cils ;

15° *Spores de divers microbes* (*B. mycoïdes*, *B. mesentericus*, *B. alvei*, etc.) : on les obtient presque complètement débarrassées de leurs bacilles par des cultures sur gélose sans peptone, dont on prépare de bonnes émulsions. Ces spores ont une membrane résistante, pas d'enveloppe muqueuse ni de cils ;

16° *Levure du vin de Huy*, isolée par M. Malvoz, belles cellules avec une membrane nette à double contour ; les cultures s'émulsionnent bien, en éléments isolés, en eau physiologique.

Tous ces microorganismes se développent bien sur gélose nutritive au bouillon de viande (pour la levure, on prend de l'agar à l'eau de malt). Les injections faites aux animaux étaient préparées en broyant le dépôt de la culture dans l'eau physiologique à 9 0/0.

Le phénomène de l'agglutination — soit dit une fois pour toutes — a toujours été étudié par addition du liquide agglutinant non pas à des microbes en bouillon (ce qui complique le phénomène à cause des produits variés des bouillons), mais à des émulsions de microbes pris sur gélose, bien dissociés en eau salée à 9 0/0. On ajoute d'abord une anse de sérum, par exemple, à une anse d'émulsion sur porte-objet, puis on dilue le sérum à 1 p. 10, 1 p. 20, etc., etc., et on ajoute chaque fois une anse de cette dilution à une anse d'émulsion.

Il est clair que s'il y a agglutination nette quand on ajoute une anse de la dilution à 1 p. 20 à une anse d'émulsion, le titre du sérum sera de 1/40.

L'observation du phénomène a toujours été faite pendant le même temps, (une heure à peu près).

Pour ce qui concerne un des microbes étudiés, le *Mycobacterium phlei*, on n'obtient des émulsions homogènes qu'en usant d'un artifice : il faut d'abord broyer le dépôt de la culture sur gélose, dans un mortier d'agate avec de l'eau physiologique, puis, après avoir trituré longtemps, on jette le liquide trouble sur un petit filtre de papier Schleicher mouillé; le liquide qui passe, légèrement opalescent, montre des bacilles fins et grêles, suffisamment isolés pour l'étude de l'agglutination. Ce microbe est tout à fait semblable, morphologiquement, au bacille de la tuberculose.

Une première série de recherches a consisté dans l'injection intrapéritonéale, à des cobayes, de ces divers microbes, dans le but de comparer le pouvoir agglutinant du sérum obtenu. Chaque microbe est cultivé sur gélose nutritive; on émulsionne le dépôt de la culture dans 1 c. c. d'eau physiologique; on chauffe une 1/2 heure à 57° (sinon les microbes pathogènes injectés vivants, comme le bacille typhique, tuent souvent le cobaye), et on pousse l'injection dans la cavité péritonéale à travers une petite incision de la paroi du ventre. On mesure, avant l'injection, le pouvoir agglutinant du sérum normal vis-à-vis du microbe injecté : aucun microbe n'était agglutiné par le sérum normal de cobaye (dans les conditions déjà décrites de notre technique de mensuration) même à parties égales de sérum et d'émulsion de microbes, sauf le *B. coli* qui subissait une légère agglutination, mais pas au-delà du titre de 1/5. Beaucoup de sérums normaux agglutinent plus ou moins le *B. coli*, ce qui est sans doute dû à la résorption physiologique de cadavres de ce bacille si abondant dans le tractus intestinal, et à la production consécutive d'une petite quantité d'anticorps.

Dix jours après la première injection à cette série de cobayes, on recueille du sérum et on mesure son pouvoir agglutinant. On obtient les titres suivants, comme taux extrêmes du phénomène :

Typhosus 1/70; *B. mycoïdes* 1/60; *Mesentericus* 1/40; Bacille V 1/50; *Capsulatus septicus* 1/35; *Capsulatus Herla* 1/25; Vaccin 1

Paris 1/15; *B. coli* 1/20; pneumobacille de Friedländer 1/1; *Capsulatus* de Pfeiffer 1/1; *Mycobacterium phlei* 1/1; *Micrococcus agilis* 1/1; levure de Huy 1/1; microcoque banal de l'air 0;

On constate de plus que le sérum Friedländer qui n'agglutine presque pas les microbes de l'espèce injectée agglutine à 1/15 le *Capsulatus Herla*, la réciproque ne se produit pas. Le sérum Pfeiffer agglutine le *Septicus* à 1/25.

On pousse une nouvelle injection et on constate, après 10 jours, (ce qui est le moment le plus favorable pour le titrage des agglutinines), que le titre de l'agglutination n'a augmenté sensiblement que chez les cobayes injectés de :

B. typhosus 1/140; *B. mycoïdes* 1/130; *B. mesentericus* 1/140, bacille V 1/110; *B. coli* 1/50, *Capsulatus* 1/50; *Micrococcus agilis* 1/15.

Or, si l'on s'en rapporte à la description morphologique de ces microbes, on est immédiatement frappé de ce fait que c'est l'injection des microbes ciliés, ou enveloppés d'une épaisse gaine muqueuse, qui a conféré au sérum le pouvoir agglutinant le plus considérable.

De plus, parmi les microbes ciliés, ce sont les éléments possédant le plus de flagella qui se montrent surtout sensibles aux agglutinines : le *B. coli*, qui possède moins de cils que le *Typhosus*; le *Mycoïdes*, etc., agglutine moins fortement que ces microbes.

Quant aux divers microbes dit capsulés, on constate que ceux qui produisent le plus d'agglutinines, dans le sérum, sont les *Capsulatus Herla*; au contraire, le pneumobacille de Friedländer et le *Capsulatus* de Pfeiffer ont présenté des titres très faibles d'agglutination. Ce sont cependant des microbes de la même famille naturelle; mais, comme il a été dit dans la description de ces microorganismes, tandis que les microbes de Herla et le *Capsulatus septicus* avaient conservé dans les milieux artificiels une capsule muqueuse très développée, celle-ci était devenue extrêmement réduite pour les microbes de Friedländer et de Pfeiffer; ce fait a été cité, d'ailleurs, par d'autres observateurs, et il est admis aujourd'hui que des microbes d'un même groupe peuvent perdre leur capsule dans les milieux de culture des laboratoires¹. Ce qui prouve bien que ces microbes appartiennent

1. D'après Danysz, certains microbes s'entourent d'une gaine muqueuse dans un but de protection contre des éléments nuisibles (charbon et arsenic).

ment à un même groupe naturel, à ce groupe étudié tout récemment encore par Clairmont (4) dans un travail très complet, c'est que le sérum Friedländer agglutine le *C. Herla* et le sérum Pfeiffer le *Septicus*.

Le vaccin du charbon s'est comporté non comme les microbes ciliés, mais comme les éléments revêtus d'une capsule muqueuse tels que le *B. capsulatus* de Herla. Or, on sait que le bacille du charbon est enveloppé d'une gaine muqueuse bien visible dans les cultures fraîches et dans le sang des animaux charbonneux.

Ce ne sont donc pas seulement les microbes à flagella qui sont particulièrement sensibles à l'action des sérums agglutinants, mais la gaine muqueuse enveloppante de certains bacilles joue également un rôle dans le phénomène de l'agglutination.

Le fait suivant vient encore à l'appui de cette thèse : il existe un microbe, le *Capsulatus mucosus* qui, d'après le travail classique de Clairmont, appartient à la même famille que le Friedländer, le *C. Herla*, le Pfeiffer, etc. C'est un bacille court engagé dans une gangue muqueuse tellement considérable que les microbes sont véritablement englués dans celle-ci : il est même impossible d'obtenir avec ce microbe des émulsions homogènes permettant la mesure de leurs agglutinines. Mais on peut injecter le *C. mucosus* à des cobayes et mesurer le titre d'agglutination non pas sur le *mucosus* lui-même, mais sur les autres représentants de ce groupe naturel se prêtant à la floculation. Eh bien, le sérum *mucosus* agglutinait après deux injections au cobaye, la *Capsulatus Herla* à 1/20, mais était sans action sensible sur le Friedländer et le Pfeiffer.

Continuant dans cette voie, nous avons encore comparé, d'une façon plus précise, le sérum Herla et le sérum Friedländer.

Nous avons injecté à 2 chiens des cultures jeunes de ces microbes (cultures gélose) dans le tissu cellulaire sous-cutané.

Après 8 injections faites de 2 en 2 jours, le chien — Herla donne un sérum agglutinant ce microbe à 1/170 mais sans action sur le bacille de Friedländer ; inversement, le sérum du chien Friedländer agglutine le B. de Herla à 1/40, mais nullement le microbe de Friedländer lui-même.

Après 22 injections, le titre agglutinatif du sérum Herla pour le B. de Herla est de 1/200, mais l'agglutination du B. de Fried-

länder est toujours nulle; réciproquement, le sérum du chien Friedländer agglutine le *Capsulatus Herla* à 1/120, mais est sans action sur le Friedländer.

Comment méconnaître dans l'interprétation de ces résultats la haute importance de l'enveloppe microbienne dans la sensibilité aux agglutinines, puisque voilà 2 microbes considérés comme très voisins dans la systématique bactériologique, qui ne diffèrent que par la constitution de leur paroi, et qui se comportent tout différemment en présence des sérums spécifiques?

Les bacilles dépourvus de cils ou de capsule muqueuse non seulement sont peu agglutinables, mais ils confèrent au sérum des animaux injectés un pouvoir agglutinant qui reste toujours relativement peu élevé.

Tout particulièrement démonstratives sont les deux expériences suivantes :

D'une part, on injecte à un chien, sous la peau, des cultures chauffées du bacille V (bâtonnets pourvus de 10-15 flagella); à un autre chien des cultures de *mycobacterium phlei*, en milieu de Hesse et également chauffées 1/2 heure à 60°.

Après 6 injections, le sérum du chien du bacille V agglutine ce bacille à 1/600, tandis que le sérum du chien injecté de *b. phlei* agglutine 1/20.

On a continué les injections de ce dernier microbe tantôt 2 c. c., tantôt 4 c. c., tantôt 10 c. c. à la fois, pendant plusieurs mois. En tout, le chien reçut 100 c. c. de culture de *b. phléole* : il n'a pas été possible de pousser le titre agglutinatif au delà de 1/20. Les émulsions homogènes du *b. phlei* étaient préparées comme il a été dit.

Les injections du même microbe chez le lapin n'ont pas donné un pouvoir agglutinant plus élevé que chez le chien.

Le bacille *phlei* ressemble beaucoup au bacille de la tuberculose. On sait que la séro-réaction dans la tuberculose reste habituellement faible, en ce sens que les titres agglutinants sont généralement de 1/10, 1/20, 1/50 maximum, alors que dans la fièvre typhoïde chez l'homme on a souvent noté une agglutination pouvant aller à 1/1000 et même davantage. Le bacille *phlei* comme le *B. tuberculosis* n'a ni flagella ni enveloppe muqueuse analogue à celles de certains microbes capsulés : de là leur faible agglutination.

Nous ferons remarquer, en passant, que l'on a donné (Beco, de Nobele, entre autres) des titres agglutinants relativement considérables pour une variété de bacille de la tuberculose, qui est le bacille d'Arloing Courmont.

Ce bacille, dont la morphologie n'a pas encore été bien étudiée, est donné comme légèrement mobile dans les bouillons et les émulsions; peut-être présente-t-il soit de petits flagella, soit une gaine enveloppante particulièrement sensible aux agglutinines.

De plus, les injections faites avec ce microbe, et qui ont conféré au sérum un pouvoir agglutinant allant jusque 1/200 et parfois plus, étaient faites non avec des émulsions en eau salée, mais avec des cultures en bouillon; de plus l'agglutination elle-même était vérifiée sur ces mêmes cultures. Nous croyons que de cette façon il se produit non seulement des agglutinines pour le microbe, mais des précipitines pour certaines substances du bouillon de culture, d'où l'augmentation *apparente* du titre d'agglutination. Il faudrait injecter des émulsions en eau salée de bacilles d'Arloing et éprouver le sérum sur une telle émulsion pour vérifier si notre hypothèse est bien exacte.

Si l'on compare les microbes ciliés entre eux, il apparaît bien encore qu'il y a réellement un rapport entre le nombre et l'importance des flagella et l'agglutination.

Prenons deux microbes inégalement ciliés, l'un le *B. typhosus* (12-15 cils), l'autre le *B. coli* (1-2-3-4 cils), et injectons-les à des lapins. Après 5 injections de 1 c. c., faites de 4 en 4 jours, le sérum du lapin-typhosus produit de grands flocons visibles à l'œil nu dans l'émulsion, tandis qu'on ne voit qu'au microscope les petits amas des microbes agglutinés par le sérum-coli.

Voici, du reste, des résultats qui viennent d'être publiés dans un travail de Castellani (3) et qui montrent très nettement le rôle des flagella dans l'agglutination. Le travail de Castellani n'a pas été fait au point de vue où nous nous plaçons : il voulait vérifier si les animaux injectés de divers microbes en même temps présentaient un sérum les agglutinant tous, et il commença par injecter séparément chaque microbe; il a pris très soigneusement, jour par jour, les titres agglutinatifs, qu'il consigne dans les tableaux que nous reproduisons ci-dessous et qui se rapportent à des injections de *B. typhosus* et de *B. coli*.

LAPIN INJECTÉ AVEC 3 CENTIMÈTRES CUBES DE CULTURE EN BOUILLON
DE BACILLE « TYPHOSUS » VIVANT

Nos des animaux.	TITRE D'AGGLUTINATION POUR LE BACILLE TYPHIQUE								
	Avant l'injection.	Après 3 jours.	Après 5 jours.	Après 7 jours.	Après 10 jours.	Après 15 jours.	Après 30 jours.	Après 60 jours.	Après 120 jours.
8	20	50	500	4.000	8.000	10.000	4.000	200	50
9	0	40	250	2.000	10.000	10.000	2.500		
10	40	100	800	5.000	10.000	10.000	2.000		
11	10	10	200	1.000	4.000	2.000			
12	40	150	1.000	5.000	10.000				

LAPIN INJECTÉ AVEC 3 CENTIMÈTRES CUBES DE CULTURE EN BOUILLON
DE BACILLE « COLI » VIVANT

Nos des animaux.	TITRE D'AGGLUTINATION POUR LE BACILLE COLI								
	Avant l'injection.	Après 3 jours.	Après 5 jours.	Après 7 jours.	Après 10 jours.	Après 15 jours.	Après 30 jours.	Après 60 jours.	Après 120 jours.
16	40	40	100	250	1.000	1.000	200	50	50
17	10	20	200	1.000	2.000	1.500			
18	20	20	250	400	2.000	2.000	200		

Il suffit de jeter un coup d'œil sur ces tableaux, pour être immédiatement frappé de la moindre sensibilité du *B. coli* à ses agglutinines, comparativement au *B. typhosus* : généralement, 10 à 15 jours après l'injection, le typhus sérum agglutine le *B. typhosus* à un titre presque dix fois supérieur à celui du coli-sérum sur le *B. coli*.

On pourrait croire qu'en injectant, comme on l'a fait dans ces expériences, des cultures en bouillon, celles-ci renferment proportionnellement plus de corps microbiens dans un même volume quand il s'agit du *B. typhosus* et que c'est là la raison du pouvoir agglutinant plus considérable du typhus sérum. Mais c'est le contraire qui est vrai : le *B. coli* en bouillon est plus prolifique que le *B. typhosus* et certainement dans les expériences dont les résultats viennent d'être transcrits, on injectait plutôt davantage de *B. coli* que de *B. typhosus*.

Voilà donc deux microbes, morphologiquement très voisins, constitués par des bâtonnets de dimensions égales, ayant des propriétés biologiques très voisines, puisque certains bactériologistes ont été jusqu'à les considérer comme appartenant à une seule espèce, et qui se comportent tout différemment vis-à-vis de leur sérum spécifique : mais l'un présente de nombreux flagella, l'autre deux ou trois cils seulement, et c'est là certainement une des raisons principales de leur sensibilité différente à leurs agglutinines.

On sait que les microbes ne sont pas seulement agglutinables par les sérums préparés contre eux, mais que certaines substances chimiques bien définies, ainsi que les recherches de M. Malvoz (6) l'ont montré, produisent très nettement un phénomène identique : telles sont la formaline, l'alcool, l'acide acétique plus ou moins dilué, la soude, etc., etc.

Ces agglutinants, dits chimiques, se comportent-ils vis-à-vis des microbes ciliés et capsulés comme les sérums spécifiques, en ce sens que, toutes choses égales d'ailleurs, un microbe à flagella par exemple sera plus facilement agglutiné qu'un microbe dépourvu de cils ?

Nous avons institué toute une série de recherches dans cette direction. A des émulsions en eau physiologique des divers microbes de la collection, nous avons ajouté des proportions très variées de formaline, d'alcool, d'acide acétique, de soude, etc., etc., et nous avons observé l'agglutination éventuelle, aussi bien à l'œil nu qu'au microscope. Nous ne nous attendions nullement à obtenir dans cette série d'essais des résultats aussi nets qu'avec les sérums spécifiques. Comme le fait très justement remarquer Nolf dans son travail classique sur les sérums antihématiques (7), les agents chimiques proprement dits, qui sont capables de provoquer l'agglutination des microbes, déploient une activité plus brutale que le sérum spécifique. L'agglutination de celui-ci, quand il est suffisamment dilué, produit à peine une légère modification de la surface du microbe, suffisante néanmoins pour être le point de départ d'une agglutination. Au contraire, une substance chimique agglutinante saisit plus brusquement et modifie plus fortement les éléments microbiens : nous avons vu ces derniers perdre immédiatement leurs mouvements, et se rapprocher de suite en quel

ques instants, ce qui ne peut être dû qu'à une altération considérable et rapide de l'enveloppe.

Néanmoins, on se rend très bien compte que l'acide acétique, par exemple, agglutine encore très bien, à certaines dilutions, les microbes ciliés ou les éléments entourés d'une capsule muqueuse, alors que le phénomène ne se produit plus sur les autres microbes.

Le *B. typhosus* est encore agglutiné par l'acide acétique à la dilution de 1/3600, le *capsulatus Herla* à 1/4500, le *B. coli* à 1/1300, le *microc. agilis* à 1/300.

Au contraire le *mycobacterium phlei* n'est plus agglutiné au delà de 1/100 d'acide acétique, le microcoque banal de l'air à 1/15 maximum et le *B. de Friedländer* à 1/10.

La formaline agglutine bien le *B. typhosus* et pas le *B. coli*, ni le *B. de Friedländer*, il en est de même pour le sublimé à 20/00.

L'alcool absolu est très agglutinant pour le bacille mycoïdes (très cilié) le *capsulatus Herla* (enveloppe muqueuse énorme), bien agglutinant pour le *B. typhosus*, moins pour le *B. coli*, nullement pour le *B. de Friedländer*, la levure, les spores, le *B. de la phléole*, etc., éléments non ciliés ni entourés d'une capsule muqueuse.

Avec la soude à des dilutions de 1 p. 60 à 1 p. 100, à cause de la réaction brutale de cette substance sur l'enveloppe très délicate des microbes, on n'observe plus, d'un élément microbien à l'autre, que des différences trop peu considérables pour qu'il y ait intérêt à les citer ici.

Les observations que nous venons d'exposer plaident certes en faveur du rôle considérable que l'enveloppe microbienne joue dans le phénomène de l'agglutination. Mais, dira-t-on, entre tous ces microbes si variés, n'y a-t-il pas d'autres propriétés que celle qui tient à la nature de leur gaine externe auxquelles il faudrait attribuer la raison des différences qui se manifestent d'une espèce à l'autre au point de vue de l'agglutination ?

Bien qu'il nous paraisse que l'ensemble des faits réunis dans ce travail plaide singulièrement en faveur d'une influence prépondérante des caractères de l'enveloppe microbienne dans la sensibilité aux agglutinines, la thèse soutenue serait bien plus solide encore si les expériences s'appuyaient non plus sur

des microbes d'espèces différentes, mais sur une seule et même espèce de bacilles, dont on produirait à volonté des modifications de l'enveloppe ciliaire.

Certains observateurs (Migula entre autres, 8), ont cité certains microbes, tel que le *microbacillus prodigiosus*, qui ne présentent des cils que quand on les cultive à une température déterminée. Ce fait nous autorisait à rechercher s'il ne serait pas possible, avec un seul et même microbe à flagella, d'obtenir une variété richement ciliée, et une autre sinon dépourvue de cils, tout au moins présentant une enveloppe très réduite.

Après avoir tenté bien des essais variés, qu'il est inutile de rapporter ici, nous avons réussi, pour ainsi dire au delà de ce que nous espérions, en choisissant comme microbe le *B. mycoïdes*, qui est un excellent élément d'études.

Le *B. mycoïdes*, cultivé à l'étuve à 37°, sur gélose nutritive peptonisée ordinaire et repiquée chaque jour, se présente comme un beau bacille très mobile, et pourvu de nombreux cils longs et flexueux plus beaux encore que ceux du *B. typhosus* (méthode Van Ermengem). Mais si on examine une culture sur agar,ensemencée non plus avec un microbe ayant poussé lui-même sur agar peptonisé, mais avec des spores de *B. mycoïdes*, l'aspect du microbes est tout différent. Les spores sont obtenues très facilement et en abondance si onensemence du *B. mycoïdes* à 37° sur de la gélose *non peptonisée* : après 4 ou 5 jours, on ne voit presque plus que des spores. Il est nécessaire qu'il n'y ait plus de bacilles visibles à côté des spores. Prenons une oese de ces spores, ensemençons-les sur agar nutritif peptonisé ordinaire et plaçons à 37° : le lendemain, on constate que toutes ces spores ont germé, mais les bacilles qui en sont issus, tout en ayant les dimensions du *B. mycoïdes* ordinaire, sont infiniment moins mobiles, et par l'emploi de la méthode Van Ermengem, on ne leur trouve qu'une enveloppe très réduite, avec cils rares et courts, ou même sans cils du tout. Ce fait n'est pas accidentel : il se produit avec une régularité constante, et nous avons obtenu ces bacilles à enveloppe ciliaire rudimentaire aussi souvent que nous l'avons voulu. Les agglutinants chimiques, tels que l'acide acétique et la soude, agissent beaucoup mieux sur la variété ciliée que sur l'autre : la première est encore agglutinée par l'acide acétique jusque 1/1000, la

soude jusque 1/80, la seconde ne l'est plus à ces dilutions des réactifs.

En possession de bacilles mycoïdes très ciliés et peu ciliés, nous avons injecté à des cobayes des émulsions des deux variétés de microbes, préparées de façon identique et contenant très approximativement le même nombre d'éléments (dépôt d'un tube de gélose émulsionnée dans 2 c. c. d'eau physiologique).

Huit jours après cette injection, le sérum du cobaye traité par le mycoïdes très cilié produit une agglutination de cette variété du microbe jusqu'au titre de 1/50; il agglutine le microbe peu cilié, moins fortement, jusqu'au titre de 1/20, mais le sérum du cobaye ayant reçu le microbe peu cilié n'agglutine ni l'une ni l'autre des 2 variétés de bacilles.

On fait de nouvelles injections à deux autres cobayes et on les répète à 10 jours d'intervalle. 8 jours après, le sérum présente les propriétés suivantes: le sérum du cobaye traité par la variété très ciliée, agglutine à la fois les 2 variétés, mais la ciliée plus que l'autre; mais le sérum de l'autre cobaye injecté 2 fois de microbes peu ciliés, s'il agglutine maintenant légèrement le bacille peu cilié (ce qui ne se produit pas après une seule injection) agglutine beaucoup plus fortement la variété ciliée.

Ces faits, que nous avons contrôlés plusieurs fois, se sont produits avec une grande netteté. Aussi croyons-nous qu'ils apportent la preuve décisive du grand rôle joué par l'enveloppe ciliaire dans l'agglutination. Ils prouvent non seulement qu'un microbe pourvu de grands et nombreux cils est plus agglutinable, toutes choses égales d'ailleurs, qu'un bacille à tunique ciliée incomplète, mais, en outre, qu'à la suite de l'injection d'une variété peu ciliée il apparaît proportionnellement moins d'agglutinines dans le sérum que chez les animaux traités par les bacilles à nombreux flagella, puisque après une première injection de *B. mycoïdes*, variété peu ciliée, le sérum n'agglutine encore aucune des deux variétés. C'est un fait expérimental qu'avait prévu M. Nolf dans son travail sur les sérums anti-hématiques, lorsqu'il annonçait qu'à son avis il devait y avoir avantage au point de vue de la production abondante d'anticorps, tels que les agglutinines, à injecter des éléments à enve-

loppe très développée comparativement au poids du microbe.

Pendant le cours de ces recherches a paru un travail de Harrison (9) qui a montré que les bacilles typhiques en partie digérés par la pyocyanase et dépouillés ainsi de leurs couches externes ne sont plus agglutinables par le typhus sérum.

Ce n'est pas seulement le phénomène de l'agglutination des microbes qui est influencé par la nature de l'enveloppe des microbes : les substances du sérum, appelées *sensibilisatrices* par Bordet, *fixateurs* par Metchnikof sont aussi plus facilement décelables vis-à-vis des éléments à tunique développée.

Si on compare, à ce point de vue, les sérums des cobayes ayant servi aux essais précédents, on obtient les résultats suivants :

La recherche des sensibilisatrices a été faite par la méthode Bordet-Gengou : les microbes sont traités par une certaine proportion (3 parties) du sérum spécifique chauffé à 56° additionné d'alexine fraîche. Après quelques heures on détermine si cette alexine est ou non fixée, en d'autres termes si les microbes sont ou non sensibilisés, par l'addition d'hématies sensibilisées elles, mêmes par un sérum hémolytique chauffé à 56° : s'il n'y a pas d'hémolyse, c'est que les microbes ont été sensibilisés et inversement.

Bien entendu, on fait des témoins dans lesquels le sérum spécifique est remplacé tantôt par de l'eau salée, tantôt par un sérum normal chauffé.

Dans ces conditions, nous avons observé que le sérum du cobaye traité par la variété très ciliée de mycoïdes, et qui agglutine si nettement ce microbe, le sensibilise fortement, tandis que la variété peu ciliée ne fixe presque pas l'alexine, ce qui montre qu'elle a retenu peu de fixateurs.

Le sérum du cobaye, ayant reçu la variété peu ciliée, renferme d'abord moins de fixateurs que le précédent et de plus ces fixateurs impressionnent bien plus la variété ciliée que l'autre.

On ne possède pas encore à l'heure actuelle de méthode précise de titrage des substances sensibilisatrices, mais l'observation de la rapidité et de l'intensité de l'hémolyse dans les divers essais précédents ne laisse pas de doute sur les relations étroites qui existent, aussi bien au point de vue de leur abondance dans le sérum que de l'impressionnabilité des éléments au

sérum lui-même, entre cils et sensibilisatrices, comme entre cils et agglutinines.

On ne peut plus douter, semble-t-il, du rôle dominant de la substance enveloppante des microbes dans le phénomène de l'agglutination. Et il semble bien que l'on puisse dire que les agglutinines sont réellement les anticorps de l'enveloppe microbienne, quelle que soit la nature de cette dernière. Ce qui le prouve bien, c'est que des éléments, telles que les levures, qui sont pourvus d'une belle capsule différenciée, de nature très résistante, sont encore agglutinables et confèrent au sérum un pouvoir agglutinant quand on se sert de levures réduites à cette capsule. M. Malvoz a placé pendant trois mois sous le chloroforme la levure du vin de Huy ayant poussé abondamment sur gélose à l'eau de malt. On sait que, dans ces conditions, se produit une auto-digestion par des ferments spéciaux de la levure. L'examen microscopique montre des coques pour ainsi dire vides, quand on a lavé plusieurs fois à l'eau physiologique; il reste seulement au centre de l'élément quelques granulations se colorant en gris noirâtre par l'acidité osmique, solubles dans un mélange d'alcool et d'éther (matières grasses). On a injecté ces levures ainsi réduites à leur capsule à des lapins, comparative-ment avec d'autres lapins traités par des levures moins digérées. Après quelques injections, le sérum était aussi agglutinant chez les uns et les autres animaux (titre 1/80), et l'agglutination se produisait aussi facilement sur les levures vides que sur les levures intactes.

Les sensibilisatrices se sont formées également bien dans les deux séries d'animaux, c'est-à-dire que la résorption des coques de levure injectées aux lapins est suivie de la production non seulement d'agglutines, mais de fixateurs et ces fixateurs sensibilisent non seulement les levures normales, mais les levures vides de leur contenu.

De plus, si on chauffe les levures à 113°, leur injection confère au sérum à la fois le pouvoir agglutinant et sensibilisateur, tout comme les spores microbiennes, et à la différence des microbes dépourvus d'une capsule résistante du type de celle de la levure.

Si on traite les levures par des substances destructives du protoplasme (eau de javelle), on note, après des lavages à l'eau

physiologique, que les levures sont encore agglutinées par leur sérum spécifique et au même titre que les levures intactes.

Des faits expérimentaux d'un autre ordre ne peuvent s'expliquer qu'en admettant une influence toute particulière des substances constituant l'enveloppe microbienne dans la production des agglutinines et dans le degré de sensibilité à ces dernières.

Nous avons injecté à un cobaye du *B. mycoïdes* vivant : après 2 injections, son sérum agglutinait le bacille vivant jusqu'au titre de 1/130, mais vis-à-vis des mêmes bacilles préalablement chauffés à 115°, l'agglutination positive, avec une forte concentration du sérum, ne dépassait pas le titre de 1/20. Si au lieu de bacilles mycoïdes vivants on injecte les mêmes bacilles chauffés à 115°, le sérum n'agglutine plus les microbes vivants, comme les microbes traités à 115°, qu'à 1/10.

Un sérum antityphique très actif (provenant de M. Van de Velde) qui agglutinait le *B. typhosus* Gaffky à 1/1.300, n'agglutine le bacille chauffé à 115° qu'à 1/400. Nous avons injecté à un cobaye du *B. typhosus* chauffé à 115° : ce sérum n'a pas agglutiné le bacille chauffé à cette température ; quant à son action sur le bacille vivant, l'agglutination n'a pas dépassé le titre de 1/10, alors que le cobaye traité par une seule injection de *B. typhosus* non modifié à 115° fournit un sérum dont le titre agglutinant dépasse toujours 1/100.

Par contre, si au lieu de microbes à tunique ciliée délicate comme les précédents, on se sert, pour des expériences de même genre, d'éléments à capsule très résistante aux agents physiques, tels que les levures et les spores, ceux-ci chauffés à 115° et injectés ensuite confèrent au sérum un pouvoir agglutinant presque aussi considérable que dans le cas de l'injection d'éléments normaux et, de plus, la sensibilité de ces spores et de ces levures aux agglutinines reste considérable.

Ces faits ne peuvent être interprétés qu'en admettant que chez les microbes à cils délicats une température de 115° produit une telle altération des substances qui constituent cette enveloppe que la production des agglutinines et beaucoup moins forte qu'à la suite de l'injection de microbes non altérés ou chauffés seulement à 60°, de même que les substances dites agglutinables de la tunique ciliée sont également altérées à 115°. Au contraire, la capsule des spores et des levures doit être constituée par des subs-

tances beaucoup moins altérables à 44⁵° : de là la production considérable d'anticorps à la suite de l'injection de ces éléments ainsi chauffés, et leur sensibilité toujours considérable aux agglutinines.

En résumé, les anticorps tels que les agglutinines et même dans une certaine mesure tout au moins les sensibilisatrices apparaissent comme des produits formés dans l'organisme à la suite de la résorption des enveloppes microbiennes : toutes choses égales d'ailleurs, plus est développée la couche périphérique d'un élément microbien, plus riche est-elle en substances capables de provoquer une réaction organique, plus abondante sera la production d'anticorps, et plus sensible aussi sera le microbe lui-même vis-à-vis de ces derniers.

Il y aura lieu dans la pratique de tenir compte de ces caractères de la gaine d'enveloppe des microbes, plus qu'on ne l'a fait jusqu'à présent, dans le diagnostic des microorganismes par les sérums spécifiques. On sait notamment qu'en injectant certaines races de *B. coli*, le sérum obtenu est plus agglutinant vis-à-vis d'autres races de coli-bacilles que vis-à-vis du microbe injecté lui-même : or, rien ne varie davantage, d'un échantillon de *B. coli* à l'autre, que la longueur et le nombre des cils et il paraît certain, d'après nos expériences, que le microbe le plus cilié sera celui qui aura le plus de chances d'être le mieux agglutiné par un sérum donné. Les variations si considérables observées dans les titres d'agglutination des sérums obtenus contre tous ces bacilles de la même famille naturelle (*B. enteritidis*) bacilles de Sirault, bacille de Moorzeele, etc.), qui jouent un si grand rôle dans certains accidents alimentaires ne sont peut-être dues qu'aux caractères particuliers de leur tunique ciliée.

Rien ne dit qu'il ne puisse se trouver dans la nature ou dans des cultures artificielles des microbes qui ont plus ou moins perdu leurs flagella tels que le *B. typhosus* : or un tel microbe se montrera fort peu sensible au typhus-sérum et de plus son injection provoquera la formation d'une proportion modérée d'agglutinines. L'emploi d'un tel sérum exposera à des erreurs graves celui qui ne tiendra pas compte des caractères spéciaux de la morphologie du microbe qui a servi aux injections ou du bacille vis-à-vis duquel on a vérifié son activité.

BIBLIOGRAPHIE

1. MALVOZ, Agglutination du *Bacillus typhosus* par des substances chimiques, *Annales Pasteur*, n° 6, 1897.
 2. DINÉUR, Recherches sur le mécanisme de l'agglutination du bacille typhique. *Bulletin de l'Académie de médecine de Belgique*, 1898.
 3. COURMONT, Deuxième note sur l'agglutination du bacille de Nicolaïer, *Société de biologie*, 4 mars 1899.
 4. CLAIRMONT, Differential diagnostische Untersuchungen über Kapselbakterien *Zeitschrift für Hygiene*, Bd. XXXIX, 1902.
 5. CASTELLANI, Die Agglutination bei gemischter Infection. *Zeitschrift für Hygiene*, XL, 1.
 6. CASTELANNI, *loco citato*.
 7. NOLF, Contribution à l'étude des sérums antihémiques. *Annales Pasteur*, 1900, n° 5.
 8. MIGULA, *System der Bakterien*. Bd. I, p. 128 et suivantes.
 9. HARRISON, The Agglutinating Substance. *Centralblatt für Bakteriologie*, vol. XXX, n° 3.
-

Le cours et les manipulations du service d'analyse et de chimie appliqué, à l'hygiène (3^e année), commenceront en novembre.

Ce cours s'adresse spécialement aux pharmaciens, médecins et chimistes, industriels.

S'adresser pour renseignements à l'Institut Pasteur, 26, rue Dutot.

LES ACCIDENTS CONSÉCUTIFS AUX VACCINATIONS

LEUR PATHOGÉNIE ET LEUR PROPHYLAXIE

PAR M. E. LECLAINCHE, DE TOULOUSE, ET M. H. VALLEE, D'ALFORT.

Toutes les méthodes d'immunisation par les virus-vaccins exposent à des accidents; le pourcentage général de ceux-ci est toujours très peu élevé; il n'est pourtant point négligeable; de plus les accidents se répartissent très irrégulièrement et, là où ils se produisent, les propriétaires en éprouvent parfois des pertes considérables.

Les mêmes faits s'observent pour les trois affections passibles de la « vaccination » par les virus modifiés : la fièvre charbonneuse, le rouget, le charbon symptomatique.

La vaccination contre le charbon bactériodien est certainement la plus sûre dans ses résultats, et cependant de loin en loin on apprend qu'elle a provoqué une certaine mortalité entre les mains de tel ou vétérinaire expérimenté. Dans un travail d'un haut intérêt et sur lequel nous reviendrons tout à l'heure, Bigoteau a rapporté des exemples frappants de ces fâcheuses surprises¹. Les mêmes faits s'observent dans tous les « pays à charbon ».

Le charbon symptomatique sembla pendant longtemps échapper à ces vicissitudes. La vaccination est obtenue ici avec une extrême facilité, puisqu'il suffit d'insérer à la queue des matières impures comme les vaccins pulvérulents ou simplement le « suc des tumeurs », comme le fait Thomas, pour immuniser sans danger dans la quasi-totalité des cas. Une plus longue expérience est venue démontrer l'insécurité de l'intervention : le taux des pertes s'est accru subitement en ces dernières années et l'excellence des résultats antérieurs a rendu d'autant plus apparente une défaillance peu alarmante en réalité.

En ce qui concerne le rouget, les accidents consécutifs à la vaccination sont encore plus nombreux. En France, la mé-

1. BIGOTEAU. Sur la pathogénie de la fièvre charbonneuse. *Revue vétérinaire*, 1893, p. 57.

thode pasteurienne ne s'est point répandue comme on pouvait l'espérer, dans la plupart des régions où la maladie sévit en permanence. Les documents que nous possédons montrent que de nombreux essais ont été tentés, mais qu'en beaucoup de points on a renoncé à la vaccination à la suite de quelque échec, bruyamment exploité d'ailleurs par des adversaires inconscients ou intéressés.

Il nous est impossible et il nous paraît inutile d'appuyer par des statistiques cette affirmation de la nocuité possible des vaccinations, et à plus forte raison d'en mesurer l'importance par des chiffres. Le fait est connu et admis par tous. On verra plus loin comment parfois la statistique la plus complète et la plus sincère est inévitablement faussée.

D'où proviennent les accidents constatés? Pourquoi les méthodes qui donnent dans le laboratoire des résultats certains se montrent-elles infidèles dans la pratique? Est-il possible d'éviter ces accidents? Ce sont ces questions complexes que nous nous proposons d'étudier ici.

I

PATHOGÉNIE DES ACCIDENTS POST-VACCINAUX

Un premier point est hors de doute. Les vaccins ne peuvent être incriminés qu'en un très petit nombre de cas. En ce qui concerne les virus-vaccins employés contre la fièvre charbonneuse et le rouget, les procédés d'atténuation permettent de régler la virulence avec une certitude presque mathématique. L'observation montre que des vaccins de même origine provoquent des accidents sur un ou quelques points seulement, alors qu'ils donnent partout ailleurs d'excellents résultats. Très souvent l'opérateur lui-même constate que le même virus employé, le même jour, dans les mêmes conditions, occasionne des pertes dans une exploitation, tandis que rien d'anormal ne se produit dans une autre toute voisine. Enfin, les vaccins éprouvent une petite partie seulement des animaux traités, les autres restant tout à fait indemnes.

Des constatations d'un autre ordre peuvent être faites. Les virus affaiblis peuvent provoquer une évolution virulente chez des animaux, qui, dans le laboratoire, supportent impunément une

inoculation du virus fort. Les bovidés, par exemple, résistent bien à l'inoculation de bactériidies très virulentes pour les autres espèces animales; comment s'expliquer que un quart de centimètre cube d'un virus aussi faible que le premier vaccin, à peine capable de tuer le lapin, puisse causer chez certains bovidés une évolution virulente mortelle? La même constatation est faite pour le rouget: le porc supporte très bien 2, parfois 5 et 10 c. c. de virus fort sous la peau; comment peut-il succomber à l'inoculation de 1/8 de centimètre cube du virus très atténué qui représente le premier vaccin de Pasteur?

Le charbon symptomatique peut aussi donner lieu à des constatations analogues, bien que les vaccins soient obtenus par une méthode tout à fait différente dans sa technique et dans son inspiration. Le vaccin tue quelques animaux inoculés à la queue alors que d'autres supportent sans faiblir l'inoculation sur le thorax, infiniment plus sévère. Des virus desséchés, chauffés à plus de 100° tuent, tandis que d'autres simplement desséchés sont inoffensifs.

L'hypothèse simpliste d'une évolution déjà commencée au moment de l'inoculation vaccinale n'est admissible qu'en de très rares circonstances. Il est puéril d'invoquer une telle coïncidence alors que la moitié des vaccinés sont affectés en même temps après l'opération. La relation entre les accidents et l'intervention est évidente.

« Ce n'est pas le vaccin qui tue, c'est la vaccination. »

Une conclusion s'impose: les accidents sont dus à des variations dans la réceptivité des vaccinés. Pour expliquer celle-ci, on a invoqué toutes les causes banales de l'étiologie, et leur insuffisance étant manifeste, on s'est livré à d'invérifiables hypothèses. En réalité les accidents sont dus *presque toujours* à une infection *latente* par le virus dont on cherche à neutraliser les effets par la vaccination: celle-ci est l'occasion qui permet l'invasion et l'évolution microbiennes.

I. *Charbon bactéridien*. — Dès 1893, Bigoteau a donné de cette interprétation, en ce qui concerne la fièvre charbonneuse, une démonstration aussi rigoureuse que possible. Ses observations montrent que les accidents sont observés, dans tous les cas, chez des animaux exposés à l'infection, dans les jours qui précèdent la vaccination. « On peut vacciner sans aucune crainte les ani-

maux importés des pays indemnes pendant les six jours qui suivent l'importation ; plus tard, au contraire, ils résistent moins bien que les autres sujets. »

2. *Charbon symptomatique*. — Nous avons pu, en ce qui a trait au charbon symptomatique, faire une série de constatations expérimentales et pratiques qui ne laissent aucun doute sur le rôle des infections latentes dans la genèse des accidents consécutifs à la vaccination.

Rappelons, tout d'abord, qu'il est possible d'obtenir des cultures pures et virulentes de charbon symptomatique, en utilisant le bouillon Martin récemment préparé.

Le chauffage, à diverses températures de cultures sporulées du *bactérium Chauvei*, permet d'obtenir une série de vaccins d'énergies différentes. Outre les avantages qu'ils présentent au point de vue pratique, ces vaccins permettent d'étudier d'une façon précise, le mécanisme de l'immunisation qu'ils procurent et autorisent à établir une comparaison exacte entre les effets de leur inoculation à des animaux sains et à des sujets en état d'infection latente. Il s'agit en effet de vaccins liquides, purs de toute souillure par des bactéries diverses, et dont les propriétés sont toujours rigoureusement comparables à elles-mêmes, à l'encontre de ce que l'on sait des vaccins pulvérulents forcément impurs, variables dans leur composition et par suite irrégulièrement actifs.

On peut inoculer impunément à des animaux de l'espèce bovine, provenant de régions non infectées, des doses considérables de ces virus-vaccins très énergiques, atténués par chauffage à 65° et même seulement à 60°.

Exemples. — Vache n° 6, reçoit le 18 février 1901, en arrière de l'épaule gauche, 3 c. c. de virus atténué à 65° pendant 2 heures. On note à la 48^e heure une hyperthermie de 0°,7 ; une petite plaque d'œdème apparaît au point de l'inoculation et disparaît en 40 heures.

Vache n° 5, inoculée le 2 février en arrière de l'épaule gauche avec 3 c. c. de vaccin obtenu par atténuation à 60° seulement. On observe localement une réaction insignifiante sans troubles généraux.

Vache n° 4, inoculée de la même façon que la vache n° 5 ; pas de réaction thermique, réaction locale fugace et très limitée.

Ces vaccins, cependant, sont actifs puisqu'ils provoquent, à la dose de 1 c. c., des accidents locaux non mortels chez le cobaye et qu'ils tuent en 24 heures le mouton, réactif plus sensible au charbon que le cobaye. D'ailleurs, les bovidés qui reçoivent une seule inoculation de ces vaccins résistent à une inoculation d'épreuve très sévère, pratiquée plusieurs jours après la vaccination.

Ces expériences de laboratoire autorisaient pleinement à tenter une application pratique de notre procédé de vaccination. En février 1904, un éleveur éclairé, M. Perrin, ingénieur agronome, nous demandait de vacciner tous les animaux de sa riche exploitation. C'est grâce à son zèle et à sa libéralité que nous avons pu effectuer nos premiers essais de vaccination; qu'il accepte ici l'expression de notre gratitude.

M. Perrin possède dans l'Aveyron un superbe domaine dans lequel il entretient en permanence 50 à 60 bovidés. Il n'a jamais constaté un seul cas de charbon sur ses animaux; par contre, la maladie sévit depuis plusieurs années à 8 ou 10 kilomètres de son exploitation. En octobre 1900, M. Perrin achète 24 animaux Salers dans le Cantal; aucun de ces animaux introduits dans son étable ne contracte le charbon; il achète plus tard à Allanche, dans le Cantal, 16 animaux Salers qu'il place à l'étable à côté du premier lot de 24 sujets.

Deux cas de charbon surviennent le 26 janvier et 7 février dans le lot provenant d'Allanche; un autre propriétaire qui a acheté, le même jour à Allanche, 4 animaux de 12 mois en perd 2 du charbon. Les animaux de cette provenance sont donc contaminés.

Avec des précautions dignes d'éloges et trop rarement prises ailleurs, M. Perrin fait enfouir les animaux morts du charbon et considère, avec raison, comme contaminés les sujets de son dernier achat. Inquiet d'autre part d'avoir chez lui ce foyer d'infection, il décide de soumettre tout l'effectif de son étable à l'inoculation préventive, et nous pratiquons cette opération les 21 et 22 février 1904.

Nous avons utilisé des cultures chauffées à 70° durant 2 heures et éprouvées sur 3 cobayes. Ces animaux ont résisté et n'ont présenté que des lésions peu graves au point d'inoculation. Les expériences rapportées plus haut (effectuées avec des cultures

du virus que M. Perrin nous avait envoyées) nous ayant montré l'innocuité de fortes doses de cultures chauffées à 65° et 60° seulement, nous opérions avec la plus grande prudence en employant du vaccin chauffé à 70° et inoffensif pour le cobaye.

Nous vaccinons donc avec ce virus 38 animaux, savoir :

2 bœufs de 3 ans avec 2 c. c. ;

3 veaux d'un an avec 1, 5 c. c. ;

34 génisses de 2 ans environ avec 1 c. c.

Chez tous les animaux l'inoculation a été pratiquée en arrière de l'épaule. Sur ce total, 24 animaux étaient considérés comme non contaminés puisqu'aucun cas de charbon n'avait été constaté parmi eux, tandis que les 14 autres étaient suspects de contamination comme faisant partie du lot de 16 animaux d'Allanche dans lequel 2 cas de charbon mortel ont été constatés.

L'inoculation a été pratiquée dans des conditions identiques chez tous, avec le même vaccin, la même seringue, la même aiguille. Tandis que les 24 animaux non suspects résistaient à la vaccination, 4 animaux sur 14 du lot contaminé mourraient des suites de l'opération et, chose curieuse, les lésions observées au point d'inoculation étaient nulles, tandis que d'importantes lésions avaient évolué dans la cavité abdominale.

Nous avons ainsi la démonstration que des vaccins, inoffensifs pour le cobaye, inoffensifs aussi pour des bovidés sains, sont dangereux chez des animaux contaminés, en état d'infection latente.

Cet état d'infection latente est donc nettement démontré ; il était aisé de prévoir son existence. Comment expliquer en effet que les animaux de l'espèce bovine deviennent réfractaires au charbon en vieillissant, si l'on n'admet l'existence de petites infections successives chez les sujets qui, entretenus dans les régions infectées ingèrent fréquemment des quantités plus ou moins considérables de spores charbonneuses ?

3. *Rouget du porc.* — Les documents abondent en ce qui concerne le rouget du porc. Une première et sommaire enquête montre que la vaccination pasteurienne fait peu de progrès dans beaucoup de régions où le rouget sévit en permanence et avec le plus de gravité. Cette résistance n'est point due seulement à l'incurie des paysans et la négligence des vétérinaires.

Presque partout des essais ont été tentés. Souvent, après quelques séries heureuses, ou même d'emblée, des accidents sont survenus.

Dans la Corrèze, des séries de « vaccinations » pratiquées à titre de démonstration par les soins de l'administration donnent 10 0/0 de pertes; dans la Haute-Garonne, les résultats sont aussi fâcheux. Au contraire, dans les régions du Nord, où le rouget presque toujours importé ne sévit pas en permanence, la vaccination pasteurienne donne des résultats excellents.

La cause de l'abandon de la vaccination tient aussi au malentendu qui s'établit entre les laboratoires et la pratique. Aux doléances des vétérinaires, les laboratoires répondent toujours dans le même sens: « nos vaccins sont inoffensifs; en dehors des preuves directes que nous avons de leur innocuité, nous savons que le vaccin qui vous a été envoyé a été inoculé sans aucun accident à des centaines d'animaux. Les suites fâcheuses ne peuvent être imputées qu'à une erreur de technique. » L'opérateur renouvelle ses essais avec plus de prudence. Au second échec il abandonne pour toujours une méthode qu'il considère comme dangereuse et qui l'expose à perdre sa clientèle.

Cette fois encore l'observation et l'expérience montrent que les accidents sont imputables à une infection préalable des animaux. On pouvait affirmer *a priori* la présence du bacille chez les porcs entretenus dans les milieux infectés; les recherches de Olt apportent une démonstration directe de ce fait¹.

Tout aussi bien, qu'il s'agisse de fièvre charbonneuse, de charbon symptomatique ou de rouget, la présence passagère, sinon permanente de la bactérie spécifique dans le tube digestif des animaux entretenus dans les régions infectées est indéniable.

L'invasion des tissus, l'évolution virulente n'est épargnée que grâce aux défenses naturelles de l'organisme: conditions chimiques du milieu stomacal ou intestinal et surtout défense phagocytaire.

Si l'organisme, déjà en état de lutte contre une infection par la voie intestinale, est attaqué sur un autre point, même par des agents peu actifs tels que des virus-vaccins, sa défense fléchit

1. Olt, Ueber die regelmässige Vorkommen der Rothlaufbacillen im Darm des Schweines. *Deutsche thierärztliche Wochenschrift*, 1901.

en se divisant, et il a de grandes chances pour succomber au choc de deux légères infections dont il eût triomphé si elles avaient agi séparément. La défense se fait mal, notamment au point d'inoculation et *l'on voit alors un animal inoculé à l'épaule avec du vaccin symptomatique succomber avec des tumeurs absolument généralisées.*

C'est ainsi qu'une évolution « naturelle » de la fièvre charbonneuse, du charbon symptomatique ou du rouget est provoquée par la vaccination. Il n'est point paradoxal de dire que ce n'est pas le vaccin qui tue, mais la vaccination. Malheureusement il est difficile de faire saisir aux paysans intéressés une distinction aussi subtile!

II

PROPHYLAXIE DES ACCIDENTS POST-VACCINAUX

Ces accidents étant dus à une infection latente antérieure, il doit être possible de les éviter en exaltant la puissance défensive de l'organisme.

C'est le but qui est cherché et atteint par les inoculations successives de sérum immunisant et de virus. Pour le charbon symptomatique, l'inoculation préalable du sérum permet à tous les animaux, même à ceux qui sont en état d'infection latente, de supporter le vaccin sans danger.

Nous avons ainsi vacciné déjà plusieurs centaines d'animaux, dans des étables infectées, sans qu'un seul accident se soit produit lorsque le sérum était d'une activité suffisante. Nous ferons connaître très prochainement les expériences réalisées.

La démonstration est complète en ce qui concerne le rouget du porc. On peut vacciner sans dangers les sujets appartenant à des effectifs gravement contaminés, à cette condition de les soumettre tout d'abord à une inoculation de sérum pur. Non seulement celle-ci répond à une indication immédiate : éviter une évolution probable ou certaine, mais elle permettra en outre d'intervenir quelques jours plus tard par la vaccination.

La sensibilité des organismes infectés est telle que non seulement les virus atténués, mais les séro-vaccins (mélange de virus et de sérum immunisant) ne peuvent être employés sans danger

dans les milieux contaminés. Les quelques accidents, constatés avec la séro-vaccination, sont observés toujours sur des animaux que L'ON REGARDAIT A TORT COMME INDÉMNES DE CONTAMINATION; au contraire, des porcs CERTAINEMENT INFECTÉS supportent sans danger soit la vaccination pasteurienne, soit le séro-vaccination, *s'ils ont reçu au préalable une injection de sérum.*

Les résultats obtenus avec le rouget et le charbon symptomatique par l'inoculation du sérum, pratiquée avant la vaccination des animaux, entretenus dans les régions infectées, est une démonstration indirecte du rôle et de l'importance des infections latentes dans la genèse des accidents post-vaccinaux.

Ces inoculations agissent en exaltant la phagocytose qui débarrasse alors l'organisme des germes qu'il recèle.

On voit disparaître dès ce moment ces oppositions étranges entre les résultats expérimentaux et ceux de la pratique. On ne voit plus succomber à l'inoculation d'une dose insignifiante d'un virus à peine actif, des animaux qui, en d'autres conditions, supportent impunément une dose vingt fois supérieure d'un virus exalté.

L'association de la sérothérapie et de la vaccination est indispensable pour une catégorie déterminée de sujets. Les deux méthodes se compléteront l'une par l'autre à tous égards. Le sérum assurera en quelques instants l'immunisation que les vaccins eussent assurée trop tard; le sérum garantira l'innocuité de la vaccination.

Nous croyons avoir apporté la preuve de ces faits en ce qui concerne le charbon symptomatique et le rouget du porc; nous essaierons de la fournir pour la fièvre charbonneuse.

*
* *

L'emploi des sérums ne permettra pas cependant d'éviter à coup sûr tous les accidents post-vaccinaux. A côté des accidents mortels, résultat d'une infection par le microbe dont on cherchait à neutraliser les effets, il peut s'en produire d'autres provoqués par un agent bien différent. Nous montrerons plus loin qu'à la suite de vaccination contre le rouget, les animaux peuvent succomber à la pasteurellose.

Ici encore il semble que c'est la vaccination qui est l'occasion de l'évolution virulente; il n'est pas illogique de penser que

l'organisme est particulièrement impressionné par la vaccination. Ce qui le prouve, c'est qu'une inoculation virulente, inoffensive dans les conditions ordinaires, ébranle vivement un animal vacciné depuis trop peu de temps ; dans les jours qui suivent la vaccination, la phagocytose doit s'exercer aussi d'une façon particulièrement élective à l'égard du virus inoculé et devenir ainsi moins vive, plus paresseuse dans la lutte contre d'autres germes.

Il se passe sans doute là quelque chose d'analogue à ce que l'on observe dans la si curieuse expérience de Roger sur l'inoculation simultanée au lapin de *B. Chauvæi* et *M. prodigiosus*. On sait que normalement le lapin peut être considéré comme réfractaire au charbon symptomatique, car les bactéries spécifiques inoculées à cet animal sont aussitôt phagocytées ; mais si l'on inocule, en même temps que celles-ci, un microbe banal, le *M. prodigiosus*, les phagocytes absorbent celui-ci, négligeant le *B. Chauvæi* ; le charbon peut alors évoluer chez le lapin.

On voit, d'après ce qui précède, que la matière est d'une difficulté et d'une complexité extrêmes. On ne peut qu'admirer l'audace des savants qui lancent des méthodes nouvelles basées sur quelques tentatives heureuses dans le laboratoire. Il faut être cent fois sûr de ses procédés avant que de les exposer au contrôle de la pratique. Même en ces conditions on ne peut attendre sans angoisse la confirmation des prévisions les plus autorisées !

L'exemple suivant est intéressant à plus d'un titre : au cours de séro-vaccinations contre le rouget pratiquées dans le Cher, l'un de nos meilleurs collaborateurs constate des séries d'accidents à la suite de l'intervention. Quelques pores succombent en des temps variables ; certains présentent les signes d'un rouget authentique ; d'autres, des troubles un peu différents ; les accidents atteignent non seulement des animaux ayant reçu d'emblée le séro-vaccin, mais aussi ceux qui ont été traités au préalable par le sérum.

L'examen des rates envoyées montre qu'en tous les cas, les animaux ont succombé à cette forme de pneumo-entérite que Lignières a démontré être due à la pasteurella.

Depuis, les mêmes faits ont été constatés sur divers points. Dans l'Ariège, le rouget éclate dans un grand élevage ; on vaccine un certain nombre de sujets. Après l'opération plusieurs animaux

tombent malades ; ils sont essoufflés ; l'un d'entre eux succombe. Les vicères renferment en abondance la pasteurella.

Ici encore l'interprétation n'est pas douteuse. Il est évident que les accidents sont le fait de la vaccination, ils doivent être imputés à son passif. Les porcs succombent parce que vaccinés ; il est à peu près certain qu'ils n'eussent présenté sans cela aucun accident. L'injection du vaccin, en diminuant la résistance de l'organisme, permet à la pasteurella, hôte normal en certaines régions des voies respiratoires ou digestives, de provoquer une infection mortelle.

On a là l'explication de certains faits. Maintes fois les viscères de porcs ayant succombé après la vaccination pasteurienne ont été adressés à des laboratoires qui ont fait cette réponse : « Le porc a succombé à la pneumo-entérite. Le vaccin n'a rien à faire par conséquent en l'espèce. » Le vétérinaire, non plus que le propriétaire, ne parvenait à s'expliquer comment la pneumo-entérite survenait au moment précis de la vaccination, tuant seulement les vaccinés, épargnant tous les autres dans le même étable et dans le voisinage. Les conséquences de ces à-coups sont faciles à prévoir : on cesse désormais de vacciner.

*
* *

Ainsi l'emploi du sérum ne supprimera pas tous les accidents post-vaccinaux ; ce qui se produit pour le rouget pourra se reproduire pour les affections charbonneuses : on pourra aussi voir des moutons ou des bovidés vaccinés contre la fièvre charbonneuse succomber à des affections pasteurelles. Mais on aura supprimé au moins la principale cause des accidents.

D'autre part, on sera prévenu de l'éventualité de défaillances qui n'auront plus rien de mystérieux, et c'est en pleine connaissance de cause que les praticiens interviendront.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FIXATEURS DU SÉRUM NORMAL DE CHIEN

PAR E. MALVOZ.

Dans leur beau mémoire sur les sensibilisatrices ou fixateurs des sérums antimicrobiens¹, MM. Bordet et Gengou disent n'avoir pas décelé ces substances dans les sérums neufs des animaux témoins qui ont servi à leurs expériences. C'est ainsi que le sérum antipesteux, préparé chez le cheval, est très riche en sensibilisatrices spécifiques, alors que le sérum normal de cet animal ne révèle pas de fixateurs pour le bacille pesteux. Le cobaye injecté de vaccin du charbon fournit un sérum sensibilisateur pour ce microbe, mais le sérum neuf de cobaye se montre totalement dépourvu de cette propriété. Et de même pour le bacille typhique, le proteus, etc., vis-à-vis desquels les sérums normaux ne manifestent pas de propriété sensibilisatrice.

Cette question des fixateurs des sérums normaux présente un grand intérêt au point de vue des doctrines générales de l'immunité : en ce qui concerne particulièrement l'état réfractaire naturel de certains animaux, il est très important d'établir si la défense est due aux seules alexines ou si celles-ci ont besoin du concours des substances sensibilisatrices, comme chez les animaux immunisés. Les observations publiées, jusqu'à présent, de fixateurs dans les sérums neufs sont fort clairsemées.

Dans son mémoire sur l'agglutination et la dissolution des hématies², Bordet s'est déjà demandé si dans les sérums neufs, l'action de l'alexine n'était pas favorisée par celle d'autres matières. En combinant l'action de 2 sérums neufs, il put constater des faits qui ne s'expliquaient bien que par la présence de fixateurs. Ainsi, les vibrions cholériques, qui ne subissent de transformation granuleuse ni dans le sérum de cheval neuf ni dans celui du cobaye normal, se transforment facilement en granules lorsqu'on les met en contact du mélange des deux sérums. Mais

1. *Annales Pasteur*, mai 1901.

2. *Annales Pasteur*, 1899, p. 295.

Bordet faisait toutes ses réserves quant à une généralisation hâtive de cette observation.

Tout récemment, Wechsberg¹, discutant certaines expériences de Wasserman, sur l'action des anticompléments chez les cobayes injectés de bacilles typhiques et se livrant à un contrôle de celles-ci, découvre que le sérum neuf chauffé de lapin doit renfermer des ambocepteurs (sensibilisatrices) pour le bacille typhique, n'agissant bien qu'avec le concours de l'alexine, non de lapin, mais de cobaye. Pfeiffer², de son côté, a signalé des sensibilisatrices pour le vibron cholérique dans le sérum normal de chèvre.

Nous venons, de notre côté, de découvrir que le sérum normal de chien renferme des fixateurs pour le bacille du charbon, ou tout au moins que si on soumet du sérum de cet animal à la série d'essais qui, dans les mains de Bordet et Gengou, ont permis la découverte de fixateurs dans les sérums antimicrobiens, le sérum de chien se comporte tout à fait comme celui d'un animal tel que le cobaye qui aurait été traité par des microbes du charbon.

Nous sommes arrivé à cette constatation d'une manière indirecte, au cours d'une étude que nous faisons sur les causes du pouvoir bactéricide du sérum de rat vis-à-vis du charbon. Ce pouvoir microbicide, on le sait, est tout particulier : il ne disparaît pas, notamment, à la suite d'un chauffage du sérum à 56°. Est-il dû à une alexine ? Non, d'après Bordet.

Pour élucider la question, nous voulions rechercher si l'injection de ce sérum chauffé, de rat à d'autres animaux serait suivie de l'apparition de substances antibactéricides (antialexines, antisensibilisatrices ?) dans leur sérum. Il fallait s'assurer d'abord que l'animal choisi pour ces injections ne présenterait pas lui-même dans son sérum des substances agissant comme anti-alexines ou antisensibilisatrices vis-à-vis du charbon. On sait que certains sérums *neufs* renferment des anticorps tels que les antitoxines diphtérique et tétanique (cheval), l'antistaphylotoxine (homme), l'anticrotine (pore), des antiferments (antiprésurs, antithrombase, anticynarase); le sérum de chèvre renferme une antisensibilisatrice contre l'hémolysine des hématies de chèvre

1. *Zeitschrift für Hygiene*, vol. 39, fasc. 1, p. 183 et s.

2. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, n° 51, 1901, p. 892.

(Ehrlich), etc. Or, en soumettant le sérum neuf de chien aux divers essais préalables qu'il fallait instituer pour déterminer notre choix, nous avons vu que, bien loin de renfermer des substances antialexiques ou antisensibilisatrices par égard au microbe du charbon, ce sérum se comporte comme s'il contenait, en abondance, des fixateurs spécifiques pour cette espèce bacillaire.

Voici les essais variés qui nous paraissent établir ce fait :

C'est la méthode Bordet-Gengou qui a été appliquée dans ces expériences ; chaque série dont l'exposé suit a été faite sur les vaccins I et II de l'Institut Pasteur, sur le bacille du charbon virulent, et sur un bacille atténué par des cultures en phénol qui nous avait été très obligeamment fourni par le Dr Malsitano.

Au moyen de cultures fraîches sur gélose à 37°, on prépare d'abord des émulsions très concentrées du microbe en eau salée à 9 0/0 ; puis dans de tout petits tubes à essai on introduit les mélanges suivants :

1° Émulsion de microbes, 4 gouttes ; sérum normal de chien adulte chauffé à 56° une demi-heure, 12 gouttes ; alexine fraîche de lapin, 2 gouttes. On laisse 6 heures en contact à la température de la chambre, puis on ajoute 2 gouttes d'hématies de poule bien lavées et sensibilisées par du sérum chauffé à 56° provenant d'un lapin injecté à 3 reprises avec du sang défibriné de poule ;

2° Même mélange que 1°, mais dans lequel le sérum chauffé de chien est remplacé par du sérum normal chauffé de cobaye ;

3° Même mélange que 1°, mais avec sérum normal de bœuf chauffé ;

4° Même mélange que 1°, mais sans microbes ;

5° Même mélange que 1°, mais où l'alexine fraîche de lapin est remplacée par de l'alexine de rat ;

6° Même mélange que 5°, mais où le sérum chauffé de chien est remplacé par de l'eau physiologique ;

7° Même mélange que 1°, mais où l'alexine fraîche de lapin est remplacée par de l'alexine de cobaye ;

8° Même mélange que 7°, mais où le sérum de chien est remplacé par de l'eau physiologique ;

9° Même mélange que 1°, mais où le sérum normal de chien chauffé est remplacé par de l'eau physiologique ;

10° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le *bacillus mycoïdes*;

11° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le *bacillus mesentericus*;

12° Même mélange que 1°, mais où le microbe du charbon est remplacé par le bacille de Friedländer.

Tous ces mélanges sont placés pendant une heure à 37°, puis abandonnés jusqu'au lendemain à la température de la chambre.

Le résultat est frappant : il n'y a pas d'hémolyse dans les mélanges où le sérum normal de chien chauffé se trouve en présence d'une part, des microbes, d'autre part, de l'alexine de lapin, de cobaye ou de rat ; tous les autres mélanges présentent une forte hémolyse des hématies.

L'examen microscopique confirme le résultat macroscopique ; l'hémolyse, là où elle existe, se caractérise par la destruction des hématies dont on ne voit plus que les noyaux.

Le résultat est surtout très net quand il s'agit du vaccin et du charbon atténué par le phénol ; parfois dans les mélanges où se trouve le charbon virulent, on trouve quelques hématies détruites.

Dans les tubes où le sérum de chien était remplacé par du sérum chauffé de cobaye ou de bœuf, l'hémolyse s'est produite aussi rapidement que dans les témoins, renfermant seulement de l'alexine, de l'eau physiologique et des microbes. Tout se passe donc comme si le sérum normal de chien renfermait des fixateurs pour le bacille du charbon, n'agissant pas sur d'autres microbes.

On remarquera que les hématies employées étaient des globules de poule sensibilisés par du sérum chauffé lapin-poule ; nous avons pu nous assurer — comme Bordet l'avait fait déjà — que l'on peut hémolyser ces hématies sensibilisées aussi bien par l'alexine fraîche de cobaye de rat ou de chien que par celle du lapin. Pourquoi n'avons nous pas employé l'alexine de chien dans tous les mélanges précités ? C'est qu'il suffit d'ajouter, au mélange de 4 gouttes d'émulsion de charbon et de 12 gouttes d'eau physiologique, 2 gouttes de sérum frais de chien pour obtenir un liquide incapable d'hémolyser les hématies sensibilisées de poule : il est vraisemblable que les fixa-

teurs présents dans cette petite quantité de sérum frais de chien suffisent pour fixer l'alexine sur les bacilles.

Quand, au lieu de sérum normal chauffé de chien comme source des sensibilisatrices, on emploie le sérum de lapin chauffé, les résultats sont variables : certains lapins nous ont fourni un sérum dépourvu de fixateurs; dans d'autres cas, le sérum paraissait renfermer une certaine proportion de sensibilisatrices, mais le phénomène était toujours moins net qu'avec le sérum de chien.

On remarquera aussi que les mélanges où le sérum de chien chauffé se trouvait seul en présence de l'alexine, sans bacilles du charbon, détruisaient parfaitement les hématies sensibilisées de poule; on ne peut donc expliquer nos résultats par la présence, dans le sérum de chien, de l'une ou l'autre substance s'opposant à l'action de l'alexine : il faut la présence de microbes du charbon pour fixer la sensibilisatrice et après celle-ci l'alexine.

Des essais d'un autre genre viennent encore plaider en faveur de l'existence de sensibilisatrices du charbon dans le sérum du chien.

On prépare une émulsion, très concentrée en eau physiologique, de bacilles du charbon (variété atténuée par le phénol). On introduit dans 2 petits tubes, et dans chacun d'eux (A, A') 6 gouttes de cette émulsion qu'on additionne ensuite de 6 gouttes de sérum normal de chien chauffé. Tandis que le tube A' sert de témoin, le mélange A, après un repos de 6 heures, est soumis à l'action de la turbine pendant 1 heure, puis on enlève avec beaucoup de précaution, au moyen d'une fine pipette le liquide, qui surnage et on l'introduit dans un tube B. Nous ajoutons 2 gouttes d'alexine fraîche de lapin à la fois à B. et à A' (A' contient encore les bacilles du charbon; B n'en contient plus). On abandonne au repos pendant quelques heures, puis à B et à A' on ajoute des hématies de poule sensibilisées par du sérum chauffé lapin-poule (on fait en même temps des témoins avec alexine de lapin, eau salée et hématies sensibilisées). Après 2 heures à 37°, on constate que les hématies sont hémolysées dans le témoin et dans B. mais sont restées intactes dans A', où il ne se produit pas de destruction des globules.

L'interprétation de ces résultats est facile si l'on admet la

présence de fixateurs dans le sérum normal de chien. Ce sérum chauffé, dépouillé de ces substances par l'addition d'une grande quantité de bacilles du charbon et débarrassé ensuite des microbes sensibilisés, laisse l'alexine, ajoutée ensuite, parfaitement libre, tandis qu'en présence des bacilles impressionnés, l'alexine se fixe fortement sur ces derniers.

Dans toutes les expériences qui viennent d'être relatées, on a fait usage du sérum de grands chiens adultes. Si, par les mêmes méthodes, on recherche la présence de fixateurs dans le sérum de jeunes chiens, les résultats sont négatifs. Nous avons pris du sang d'un chien âgé de 13 jours : chauffé 1/2 heure à 56°, le sérum ne fixe sur les vaccins et sur le charbon virulent, ni l'alexine de chien ni celle de lapin ou de cobaye.

L'alexine de ce jeune chien était nettement hémolytique pour les hématies sensibilisées de poule.

Si, au lieu d'opérer sur le sérum de chien, on recherche par ces méthodes les fixateurs éventuels du sérum normal de rat, on obtient des résultats négatifs. Si on prend, par exemple, des microbes du charbon ou du vaccin charbonneux, mélangés à du sérum normal de rat préalablement chauffé à 56° et additionnés d'alexine de lapin, ou de cobaye dans les conditions habituelles de ces expériences, on n'observera pas de sensibilisation des bacilles : l'alexine reste libre et capable d'hémolyser, aussi fortement que les témoins où le sérum de rat est remplacé par de l'eau physiologique, les hématies sensibilisées de poule. Le résultat est le même si, au lieu d'alexine de lapin ou de cobaye, on se sert d'alexine de rat, qui elle aussi détruit parfaitement les globules de poule sensibilisés par le sérum lapin-poule.

Mais si nous ne constatons l'absence de sensibilisatrices des bacilles du charbon, en présence du sérum de rat chauffé, qu'en nous servant de l'alexine de rat le résultat resterait douteux. En effet, le sang de rat est tout différent de celui des autres animaux. Son pouvoir bactéricide ne disparaît pas après un chauffage à 56°, alors que le sérum de lapin, souvent bactéricide pour le charbon, n'est plus actif après avoir été soumis à cette température. Au contraire, l'alexine hémolytique de rat, ainsi que nous l'avons constaté, ne résiste pas à un chauffage à 56°, c'est-à-dire que le sérum

frais de rat ainsi chauffé n'est plus capable d'hémolyser les hématies sensibilisées de poule. Bordet¹ avait déjà signalé que le sérum de rat chauffé à 56° perd l'alexine capable de provoquer le phénomène de Pfeiffer sur les vibrions sensibilisés par le choléra-sérum. Il y a donc dans le sérum de rat deux substances actives très différentes : une alexine, semblable à l'alexine des deux autres sérums neufs, et une autre substance, qui n'est peut-être pas une alexine, douée de propriétés bactéricides et résistant à 56°. Même si une hémolyse se produisait dans les mélanges de bacilles du charbon, de sérum de rat chauffé et de sérum frais de rat, additionnés d'hématies sensibilisées de poule, on ne pourrait donc pas en conclure que le sang de rat ne renferme pas de fixateurs pour le charbon, l'alexine hémolytique étant différente de la substance bactéricide. Mais l'expérience faite avec l'alexine de lapin ou de cobaye permet de conclure à l'absence de sensibilisatrices, tout au moins à la quantité incomparablement inférieure de celles-ci par rapport au sérum de chien, dans le sérum de rat chauffé à 56°.

*
*
*

Il est impossible de ne pas être frappé de ce fait qu'il existe une relation entre l'existence ou l'absence de fixateurs pour le bacille du charbon dans les divers sérums que nous avons étudiés et la sensibilité des animaux correspondants à l'infection charbonneuse.

Le chien adulte est considéré comme l'animal le plus réfractaire au charbon ; or, son sérum paraît contenir des fixateurs spécifiques en abondance. Le chien nouveau-né est beaucoup plus sensible au charbon que l'adulte : son sérum est dépourvu de sensibilisatrices spécifiques.

Le cobaye, le bœuf, animaux sensibles, ont un sang dépourvu de ces sensibilisatrices. Le lapin, qui présente parfois une certaine résistance au charbon virulent et en tout cas ne succombe pas au premier vaccin, manifeste dans certains cas des propriétés sensibilisatrices de sérum vis-à-vis de la bactérie.

Reste le cas du rat : bien que son sang *in vitro* soit très bactéricide pour le charbon, il est admis aujourd'hui que cet

1. *Annales Pasteur*, 1899, page 291.

animal n'est nullement réfractaire au charbon; que, bien au contraire, si au moment de l'injection de bacilles, on sait éviter l'action bactéricide du sang extravasé, le long de la piqûre, le rat devient très sensible à l'infection. Or, son sérum ne paraît pas renfermer de sensibilisatrices spécifiques pour le microbe du charbon.

C'est à se demander si ce pouvoir bactéricide *in vitro* des sérums normaux vis-à-vis du charbon n'est pas une propriété accidentelle n'ayant rien à faire avec la défense de l'organisme vivant. En effet, le sérum de chien n'est pas bactéricide *in-vitro* pour le charbon, et cet animal est beaucoup plus réfractaire que le rat! Et cette absence de pouvoir bactéricide dans le sérum de chien n'a pas laissé d'embarrasser beaucoup ceux qui ont fait de ce phénomène la base de leur explication de l'état réfractaire. Mais la présence de fixateurs spécifiques vient jeter une nouvelle lumière sur les causes de l'immunité naturelle du chien vis-à-vis du charbon. Ces fixateurs ne suffisent pas, même avec l'aide de l'alexine normale du chien, pour tuer les bacilles du charbon en dehors du corps dans le sang extravasé!

Mais dans l'organisme vivant où les conditions sont toutes différentes, ces fixateurs doivent favoriser énergiquement l'action des alexines contenues dans les phagocytes et qui sont autrement puissantes que celles qui s'échappent des globules blancs pendant la coagulation du sang *in vitro*.

Nous avons essayé, mais sans avoir réussi jusqu'à présent, de détruire les bacilles du charbon *in vitro* au moyen de sérum chauffé de chien réactivé par des alexines autres que celles du chien (cobaye, par exemple). Il ne faut pas perdre de vue que les sérums d'animaux les plus fortement immunisés contre les microbes pathogènes, contenant de grandes quantités de sensibilisatrices spécifiques, ne sont guère bactéricides *in vitro*, sauf pour le cas de microbes très fragiles tels que le vibrion cholériques.

Les espèces microbiennes résistantes, même sensibilisées par les fixateurs spécifiques, ne semblent pouvoir être bien détruites qu'à l'intérieur des phagocytes vivants grâce aux alexines élaborées par ceux-ci.